

## P. .NT COOPERATION TREA

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
 United States Patent and Trademark  
 Office  
 Box PCT  
 Washington, D.C.20231  
 ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing (day/month/year)</b> 08 November 1999 (08.11.99)	
<b>International application No.</b> PCT/JP99/01481	<b>Applicant's or agent's file reference</b> JA908155
<b>International filing date (day/month/year)</b> 24 March 1999 (24.03.99)	<b>Priority date (day/month/year)</b> 24 March 1998 (24.03.98)
<b>Applicant</b> MORI, Satoshi et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

20 October 1999 (20.10.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<b>The International Bureau of WIPO</b> 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	<b>Authorized officer</b> Maria Kirchner Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	---



答 弁 書



特許庁審査官

長井 啓子 殿

1. 国際出願の表示

PCT / JP 99 / 01481

2. 出願人 (代表者)

氏名 (名称)

科学技術振興事業団

JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION

あて名

〒332-0012

日本国埼玉県川口市本町四丁目1番8号

1-8, Honcho 4-chome, Kawaguchi-shi, Saitama,

332-0012 JAPAN

国籍

日本国 JAPAN

住所

日本国 JAPAN

3. 代理人

氏 名

(10266) 弁理士 佐伯 憲生

SAEKI Norio



あて名

〒103-0027

日本国東京都中央区日本橋三丁目15番2号

高愛ビル 9階

9th floor, Taka-ai Building, 15-2,

Nihonbashi 3-chome, Chuo-ku, Tokyo 103-0027 JAPAN

4. 通知の日付

01.02.00

5. 答弁の内容

(1) 補正について

今回の審査官殿の御指摘に鑑み本日、本件の請求の範囲を同時に提出いたしました手続手続補正書にて補正いたしました。

補正後の請求の範囲第1項及び第7項は、次の通りであります。

「1. (補正後) 有用植物に他の種の遺伝子を導入して有用植物を形質転換す





る方法において、導入される他の遺伝子がコードする蛋白質が有する機能を実質的に変更することなく、8塩基以上連続したG又はTのみの配列を含まず、かつ当該他の遺伝子の塩基配列中のGTーリッチな塩基配列の下流側に存在するNATAAA、ANTAAA、AANAAA、AATNAA、AATANA、又は、AATAAN（塩基配列中のNは任意の塩基を示す。）で示されるいずれの塩基配列も含まないように設計することを特徴とする有用植物を形質転換する方法。」

「7.（補正後）さらに、導入される遺伝子の全領域にわたって塩基のG及びCの含有量の差が少ないことを特徴とする請求の範囲第1項に記載の方法。」

補正前の請求の範囲第3項は削除いたしました。さらに補正前の請求の範囲第4項の内容を請求の範囲第1項に加入し補正前の第4項を削除しました。

今回請求の範囲第1項に加入した事項は、本件明細書の第7又は17頁に記載されている事項であります。

## （2）文献1及び2に記載されている事項と本件発明との対比

文献1（Perlak F. J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., vol.88, p.3324-3328 (1991)）には、*Bacillus thuringiensis*由来の昆虫制御タンパク質をコードする遺伝子を植物中で発現させるために、mRNAを不安定にするATTTA配列（文献1、第3324頁右欄）、AACCAA及びAATTTAからなるポリ（A）付加に関係する要素の領域（文献1、第3328頁左欄）、及びAーTリッチな領域（文献1、第3328頁左欄）を改変することが記載されています（文献1、第3328頁左欄）。

しかしながら、文献1には本件発明に係る

- ① 8塩基以上連続したG又はTのみの配列を含まず、かつ
- ② GTーリッチな塩基配列の下流側に存在するAATAAA類似の塩基配列を含まない

ように設計することについては、何ら記載されておられませんし、これを示唆する記載もなされておられません。

さらに、文献1には本件の請求の範囲第7項に記載の



③ 導入される遺伝子の全領域にわたって塩基の G 及び C の含有量の差が少ない

ようにすることについても何ら記載も示唆もされておられません。

そして、他の生物の遺伝子を有用植物に導入する際において、当該遺伝子の塩基配列をどのように改変すれば、その発現率を上げることができるかという一般的な指針もなく、仮に文献 1 における開示があったとしても、本件発明における改変の方法を当業者が容易に想到し得ることはできないのであります。

そして、本件発明は、係る改変方法により他の生物の遺伝子を有用植物において高い発現率で発現させ得るという予想外に顕著な効果をそうするものであることは本件明細書に記載されているとおりであります。

したがって、補正後の請求の範囲第 1 項に記載の発明は、文献 1 に記載の発明が公知であったとしても、新規性及び進歩性を有するものであり、これを引用する請求の範囲第 2 ～ 19 項に記載も同様に新規性及び進歩性を有するものであります。

なお、文献 2 (Dancis A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., vol.89, p. 3869-3873 (1992)) には、酵母の F R E 1 遺伝子が記載されておりますが、本件発明における改変方法を何ら開示するものではなく、文献 2 の存在により本件発明の進歩性が否定されるものでないことは前述してきたと同様であります。

以上のとおりでありますから、本件の補正後の請求の範囲に記載の発明はいずれも新規性、進歩性及び産業上の利用可能性を有するものであります。

以 上



## 手 続 補 正 書

(法第11条の規定による補正)



特許庁審査官

長井 啓子 殿

1. 国際出願の表示 PCT/J P 99 / 0 1 4 8 1

2. 出願人 (代表者)

氏名 (名称)

科学技術振興事業団

JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION

あて名

〒332-0012

日本国埼玉県川口市本町四丁目1番8号

1-8, Honcho 4-chome, Kawaguchi-shi, Saitama,

332-0012 JAPAN

国籍

日本国 JAPAN

住所

日本国 JAPAN

3. 代理人

氏 名

(10266) 弁理士 佐伯 憲生

SAEKI Norio



あて名

〒103-0027

日本国東京都中央区日本橋三丁目15番2号

高愛ビル 9階

9th floor, Taka-ai Building, 15-2,

Nihonbashi 3-chome, Chuo-ku, Tokyo 103-0027 JAPAN

4. 補正の対象

請求の範囲

5. 補正の内容

請求の範囲第34頁第1項の「当該他の遺伝子の塩基配列中に存在する形質転換される有用植物のmRNAのポリ(A)付加に関係する要素の領域を、mRNAのポリ(A)付加に関係しないような他の塩基配列に改変する」を「8塩基以上連続したG又はTのみの配列を含まず、かつ当該他の遺伝子の塩基配列中のGT-リッチな塩基配列の下流側に存在するNATAAA、ANTAAA、ANAAA、AATNAA、AATANA、又は、AATAAN (塩基配列中のNは任意の塩基を示す。)で示されるいずれの塩基配列も含まないように設計する」に補正し、第3項及び第4項を削除し、第7項の「塩基配列の改変が」を「さらに」に補正する。第5項の「1～4項」を「1～2項」に補正する。

6. 添付書類の目録

請求の範囲第34頁



## 請 求 の 範 囲

1. (補正後) 有用植物に他の種の遺伝子を導入して有用植物を形質転換する方法において、導入される他の遺伝子がコードする蛋白質が有する機能を実質的に変更することなく、8塩基以上連続したG又はTのみの配列を含まず、かつ当該他の遺伝子の塩基配列中のGT-リッチな塩基配列の下流側に存在するNATAAA、ANTAAA、AANAAA、AATNAA、AATANA、又は、AATAAN(塩基配列中のNは任意の塩基を示す。)で示されるいずれの塩基配列も含まないように設計することを特徴とする有用植物を形質転換する方法。
2. 導入される他の種の遺伝子が、酵母由来のものである請求の範囲第1項に記載の方法。
3. (削除)
4. (削除)
5. (補正後) mRNAのポリ(A)付加に関する要素の領域の塩基配列の改変が、形質転換される有用植物のコドン利用率に基づいて行われる請求の範囲第1～2項のいずれかに記載の方法。
6. 塩基配列の改変が、塩基のG及びTが豊富な領域が少なくなるように行われることを特徴とする請求の範囲第1～5項のいずれかに記載の方法。
7. (補正後) さらに、導入される遺伝子の全領域にわたって塩基のG及びCの含有量の差が少ないことを特徴とする請求の範囲第1～6項のいずれかに記載の方法。
8. 塩基配列の改変が、ATTTA配列を有さないように行われることを特徴とする請求の範囲第1～7項のいずれかに記載の方法。
9. 導入される遺伝子の開始コドンの上流に、コザック配列(Kozak配列)を有することを特徴とする請求の範囲第1～8項のいずれかに記載の方法。
10. 導入される遺伝子が、栄養分の吸収に関与する蛋白質をコードするものである請求の範囲第1～9項のいずれかに記載の方法。
11. 導入される遺伝子が、三価鉄還元酵素FRE1をコードする遺伝子である





# PATENT COOPERATION TREATY

WO 99/48356  
PCT/JP99/01481

**PCT**

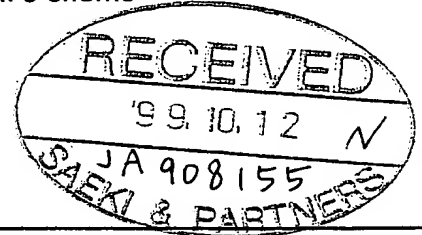
## NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SAEKI, Norio  
Taka-ai Building, 9th floor  
15-2, Nihonbashi 3-chome  
Chuo-ku  
Tokyo 103-0027  
JAPON



<b>Date of mailing (day/month/year)</b> 30 September 1999 (30.09.99)		
<b>Applicant's or agent's file reference</b> JA908155		<b>IMPORTANT NOTICE</b>
<b>International application No.</b> PCT/JP99/01481	<b>International filing date (day/month/year)</b> 24 March 1999 (24.03.99)	<b>Priority date (day/month/year)</b> 24 March 1998 (24.03.98)
<b>Applicant</b> JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:  
**AU,EP,US**

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:  
**CA**

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 30 September 1999 (30.09.99) under No. WO 99/48356

### REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

### REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer  <p style="text-align: center;">J. Zahra</p> Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

10



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED  
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SAEKI, Norio  
Taka-ai Building, 9th floor  
15-2, Nihonbashi 3-chome  
Chuo-ku  
Tokyo 103-0027  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 08 November 1999 (08.11.99)		IMPORTANT INFORMATION	
Applicant's or agent's file reference JA908155			
International application No. PCT/JP99/01481	International filing date (day/month/year) 24 March 1999 (24.03.99)	Priority date (day/month/year) 24 March 1998 (24.03.98)	
Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION et al			

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE  
National : AU, CA, US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

None

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer: Maria Kirchner</p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
---	--



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF  
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SAEKI, Norio  
Taka-ai Building, 9th floor  
15-2, Nihonbashi 3-chome  
Chuo-ku  
Tokyo 103-0027  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 23 April 1999 (23.04.99)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference JA908155	International application No. PCT/JP99/01481

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION (for all designated States except US)  
MORI, Satoshi et al (for US)

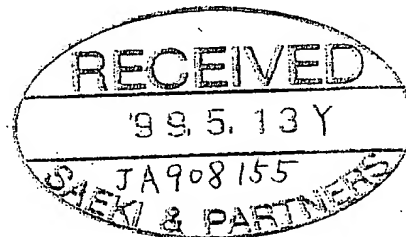
International filing date : 24 March 1999 (24.03.99)

Priority date(s) claimed : 24 March 1998 (24.03.98)

Date of receipt of the record copy  
by the International Bureau : 09 April 1999 (09.04.99)

List of designated Offices :

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE  
National : AU, CA, US




## ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase
- ☒ confirmation of precautionary designations
- ☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer:</p> <p>M. Sakai </p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
---	---



**INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE**

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated in the Notification of Receipt of Record Copy (Form PCT/IB/301) by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by the applicable national laws.

The time limit for performing these procedural acts is **20 MONTHS** from the priority date or, for those designated States which the applicant elects in a demand for international preliminary examination or in a later election, **30 MONTHS** from the priority date, provided that the election is made before the expiration of 19 months from the priority date. Some designated (or elected) Offices have fixed time limits which expire even later than 20 or 30 months from the priority date. In other Offices an extension of time or grace period, in some cases upon payment of an additional fee, is available.

In addition to these procedural acts, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. **It is the applicant's responsibility** to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most designated Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

**For detailed information about the procedural acts to be performed to enter the national phase before each designated Office, the applicable time-limits and possible extensions of time or grace periods, and any other requirements, see the relevant Chapters of Volume II of the PCT Applicant's Guide. Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in Chapter IX of Volume I of the PCT Applicant's Guide.**

GR and ES became bound by PCT Chapter II on 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, and may, therefore, be elected in a demand or a later election filed on or after 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, regardless of the filing date of the international application. (See second paragraph above.)

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

**CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS**

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(c) before the expiration of 15 months from the priority date. If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with an indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

**REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS**

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.





## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

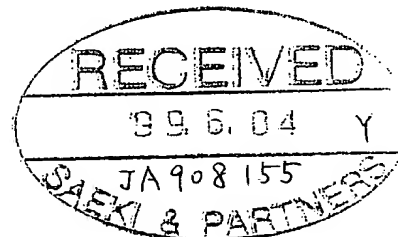
To:

SAEKI, Norio  
Taka-ai Building, 9th floor  
15-2, Nihonbashi 3-chome  
Chuo-ku  
Tokyo 103-0027  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 26 May 1999 (26.05.99)	
Applicant's or agent's file reference JA908155	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
International application No. PCT/JP99/01481	International filing date (day/month/year) 24 March 1999 (24.03.99)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 24 March 1998 (24.03.98)
Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION et al	

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
24 Marc 1998 (24.03.98)	10/96637	JP	21 May 1999 (21.05.99)

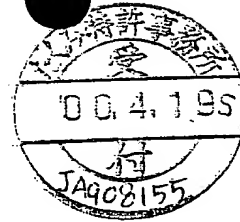


The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer  Juan Cruz  Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--



特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）



出願人代理人

佐伯 憲生

殿

あて名

〒 103-0027

東京都中央区日本橋3丁目15番2号  
高愛ビル9階 たくみ特許事務所

PCT

国際予備審査報告の送付の通知書

（法施行規則第57条）  
〔PCT規則71.1〕

発送日  
（日.月.年）

18.04.00

出願人又は代理人  
の書類記号

JA908155

重要な通知

国際出願番号

PCT/JP99/01481

国際出願日

（日.月.年） 24.03.99

優先日

（日.月.年） 24.03.98

出願人（氏名又は名称）

科学技術振興事業団

1. 国際予備審査機関は、この国際出願に関して国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、それらをこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

2. 国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、すべての選択官庁に通知するために、それらの写しを国際事務局に送付する。

3. 選択官庁から要求があったときは、国際事務局は国際予備審査報告（付属書類を除く）の英語の翻訳文を作成し、それをその選択官庁に送付する。

4. 注 意

出願人は、各選択官庁に対し優先日から30月以内に（官庁によってはもっと遅く）所定の手続（翻訳文の提出及び国内手数料の支払い）をしなければならない（PCT39条（1））（様式PCT/IB/301とともに国際事務局から送付された注を参照）。

国際出願の翻訳文が選択官庁に提出された場合には、その翻訳文は、国際予備審査報告の付属書類の翻訳文を含まなければならない。

この翻訳文を作成し、関係する選択官庁に直接送付するのは出願人の責任である。

選択官庁が適用する期間及び要件の詳細については、PCT出願人の手引き第II巻を参照すること。

名称及びあて名

日本国特許庁（IPEA/JP）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特 許 庁 長 官

2B 9123

電話番号 03-3581-1101 内線 3236

様式PCT/IPEA/416（1992年7月）

（添付用紙の注意書きを参照）



## 注 意

### 1. 文献の写しの請求について

国際予備審査報告に記載された文献であって国際調査報告に記載されていない文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することができますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

〔申込方法〕

(1) 特許（実用新案・意匠）公報については、下記の点を明記してください。

○特許・実用新案及び意匠の種類

○出願公告又は出願公開の年次及び番号（又は特許番号、登録番号）

○必要部数

(2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

○国際予備審査報告の写しを添付してください（返却します）。

〔申込み及び照会先〕

〒100 東京都千代田区霞が関3-4-2 商工会館・弁理士会館ビル  
財団法人 日本特許情報機構 サービス課  
TEL 03-3503-3900

注) 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。

### 2. 各選択官庁に対し、国際出願の写し（既に国際事務局から送達されている場合は除く）及びその所定の翻訳文を提出し、国内手数料を支払うことが必要となります。その期限については各国ごとに異なりますので注意してください。（条約第22条、第39条及び第64条(2)(a)(i)参照）



特 許 協 力 条 約

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
〔PCT36条及びPCT規則70〕

出願人又は代理人 の書類記号 JA908155	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P99/01481	国際出願日 (日.月.年) 24.03.99	優先日 (日.月.年) 24.03.98
国際特許分類(IPC) Int. Cl. 7 A01H 5/00, C12N 15/09, C12N 15/31		
出願人(氏名又は名称) 科学技術振興事業団		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。  <input checked="" type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で 1 ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。  I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 20.10.99	国際予備審査報告を作成した日 07.04.00	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 長 井 啓 子	2 B 9 1 2 3
電話番号 03-3581-1101 内線 3236		





## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

- ☒ 明細書 第 1-33 ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☒ 請求の範囲 第 2, 6, 8-21 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 1, 5, 7 項、 03.04.00 付の書簡と共に提出されたもの
- ☒ 図面 第 1-18 ページ/図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☒ 明細書の配列表の部分 第 1-22 ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☒ 請求の範囲 第 3, 4 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)

請求の範囲 1, 2, 5-21 有  
請求の範囲 無

進歩性(IS)

請求の範囲 1, 2, 5-21 有  
請求の範囲 無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲 1, 2, 5-21 有  
請求の範囲 無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1, 2及び5-21について

国際調査報告で引用した文献を含むいずれの文献にも、導入される他の遺伝子がコードする蛋白質が有する機能を実質的に変更することなく、8塩基以上連続したG又はTのみの配列を含まず、かつ当該他の遺伝子の塩基配列中のGT-リッチな塩基配列の下流側に存在するNATAAA、ANTAAA、ANAAAA、AATNAA、AATANAA、又は、AATAAN(塩基配列中のNは任意の塩基を示す。)で示されるいずれの塩基配列も含まないように設計してなる他の種の遺伝子を導入して植物を形質転換することについては、記載も示唆もされていない。植物に上記のように設計してなる他の遺伝子を導入することにより、当該他の遺伝子が十分に発現することは、当業者にとって自明ではない。



特許協力条約

発信人 日本国特許庁 (国際予備審査機関)



出願人代理人

佐伯 憲生

殿

あて名

〒 103-0027

東京都中央区日本橋3丁目15番2号  
高愛ビル9階 たくみ特許事務所

PCT見解書

(法第13条)  
[PCT規則66]

発送日  
(日.月.年)

01.02.00

出願人又は代理人  
の書類記号

JA908155

応答期間

上記発送日から 2 月/日以内

国際出願番号

PCT/J P 99/01481

国際出願日

(日.月.年) 24. 03. 99

優先日

(日.月.年) 24. 03. 98

国際特許分類 (IPC)

Int. Cl. ' A01H 5/00, C12N 15/09, C12N15/31

出願人 (氏名又は名称)

科学技術振興事業団

1. これは、この国際予備審査機関が作成した 1 回目の見解書である。

2. この見解書は、次の内容を含む。

I ☒ 見解の基礎

II ☐ 優先権

III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成

IV ☐ 発明の単一性の欠如

V ☒ 法第13条 (PCT規則66.2(a)(ii)) に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明

VI ☐ ある種の引用文献

VII ☐ 国際出願の不備

VIII ☐ 国際出願に対する意見

3. 出願人は、この見解書に応答することが求められる。

いつ?

上記応答期間を参照すること。この応答期間に間に合わないときは、出願人は、法第13条 (PCT規則66.2(d)) に規定するとおり、その期間の経過前に国際予備審査機関に期間延長を請求することができる。ただし、期間延長が認められるのは合理的な理由があり、かつスケジュールに余裕がある場合に限られることに注意されたい。

どのように?

法第13条 (PCT規則66.3) の規定に従い、答弁書及び必要な場合には、補正書を提出する。補正書の様式及び言語については、法施行規則第62条 (PCT規則66.8及び66.9) を参照すること。

なお

補正書を提出する追加の機会については、法施行規則第61条の2 (PCT規則66.4) を参照すること。補正書及び/又は答弁書の審査官による考慮については、PCT規則66.4の2を参照すること。審査官との非公式の連絡については、PCT規則66.6を参照すること。

応答がないときは、国際予備審査報告は、この見解書に基づき作成される。

4. 国際予備審査報告作成の最終期限は、PCT規則69.2の規定により 24. 07. 00 である。

名称及びあて先

日本国特許庁 (IPEA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長 井 啓 子

2 B

9 1 2 3

電話番号 03-3581-1101 内線 3236



## I. 見解の基礎

1. この見解書は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に回答するために提出された差替え用紙は、この見解書において「出願時」とする。)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき見解書を作成した。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この見解書は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))





## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第13条 (PCT規則66.2(a)(ii)に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	2, 4, 6, 7, 9-13, 19-21	有
	請求の範囲	1, 3, 5, 8, 14-18	無
進歩性 (IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1 - 21	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1 - 21	有
	請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明

## (1) 請求項1, 3-8, 13-18及び21について

文献1: Perlak F. J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., vol. 88, p. 3324-3328 (1991)

上記文献1には、タバコ及びトマトにBacillus thuringiensisの遺伝子を導入して形質転換する方法において、導入される遺伝子がコードする蛋白質が有する機能を実質的に変更することなく、当該遺伝子の塩基配列中に存在する形質転換される植物のmRNAのポリ(A)付加に関する要素の領域(ATTTA, AATAA A又はAATAAT)を、mRNAのポリ(A)付加に関係しないような他の塩基配列であって当該植物のコドン利用率の高いものに改変することによって、当該遺伝子の発現量を増加させることが記載されている。

## (2) 請求項2, 10-12, 19及び20についてについて

文献2: Dancis A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., vol. 89, p. 3869-3873 (1992)

上記コメント(1)を参照のこと。

導入される他の種の遺伝子は当業者が必要に応じて変更しうるものである。酵母のFRE1をコードする遺伝子については上記文献2に記載されている。

## (3) 請求項9について

上記コメント(1)を参照のこと。また、コザック配列は真核生物でmRNAが効率よく翻訳されるための配列として広く知られているので、それを導入される遺伝子に付加することは当業者が容易に想到し得る程度のことである。



朝鮮庁長官 (朝鮮庁審査官)	股 販)
1 国輸出願の表示	
2 出願人 (代表者) 氏名 (名称) あて名 国籍 住所	
3 代理人 氏名 あて名	
4 補正命令の日付	
5 補正の対象	
6 補正の内容	
7 補正符號の目録	



特許協力条約に基づく国際出願  
国際予備審査請求書

第 II 章

出願人は、次の国際出願が特許協力条約に従って国際予備審査の対象とされることを請求し、  
選択資格のある全ての国を選択する。ただし、特段の表示がある場合を除く。

国際予備審査機関記入欄		
国際予備審査機関の略称	請求書の受理の日	
第 I 欄 国際出願の表示		
出願人又は代理人の書類記号	JA908155	
国際出願番号	国際出願日 (日. 月. 年)	優先日 (最先のもの) (日. 月. 年)
PCT/JP99/01481	24.03.99	24.03.98
発明の名称		
植物を形質転換する方法及びその植物並びにその遺伝子		
第 II 欄 出願人		
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)		電話番号:
科学技術振興事業団 JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION  〒332-0012 日本国埼玉県川口市本町四丁目1番8号 1-8, Honcho 4-chome, Kawaguchi-shi, Saitama, 332-0012 JAPAN		048-226-5619
		ファクシミリ番号:
		048-226-5652
		加入電信番号:
国籍 (国名): 日本国 JAPAN	住所 (国名): 日本国 JAPAN	
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)		
森 敏 MORI Satoshi  〒275-0026 日本国千葉県習志野市谷津6-7-2-301 6-7-2-301, Yatsu, Narashino-shi, Chiba-ken, 275-0026 JAPAN		
国籍 (国名): 日本国 JAPAN	住所 (国名): 日本国 JAPAN	
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)		
中西 啓仁 NAKANISHI Hiromi  〒113-0032 日本国東京都文京区弥生1-1-1 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032 JAPAN		
国籍 (国名): 日本国 JAPAN	住所 (国名): 日本国 JAPAN	
<input checked="" type="checkbox"/> その他の出願人が縦裏に記載されている。		



## 第 II 欄の続き 出願人

この第 II 欄の続きを使用しないときは、この用紙を国際予備審査請求書に含めないこと。

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

大木 宏之 OKI Hiroyuki

〒113-0032 日本国東京都文京区弥生 1-1-1

1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032 JAPAN

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

山口 博隆 YAMAGUCHI Hirotaka

〒113-0032 日本国東京都文京区弥生 1-1-1

1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032 JAPAN

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

国籍 (国名):

住所 (国名):

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

国籍 (国名):

住所 (国名):



その他の出願人が他の欄に記載されている。





## 第三欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

下記に記載された者は、☒ 代理人 又は ☐ 共通の代表者 として

☒ 既に選任された者であって、国際予備審査についても出願人を代理する者である。

☐ 今回新たに選任された者である。 先に選任されていた代理人又は共通の代表者は解任された。

☐ 既に選任された代理人又は共通の代表者に加えて、特に国際予備審査機関に対する手続きのために、今回新たに選任された者である。

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

10266 弁理士 佐伯 憲生 SAEKI Norio

電話番号:

03-5205-2521

ファクシミリ番号:

03-5205-2522

加入電話番号:

〒103-0027 日本国東京都中央区日本橋三丁目15番2号

高愛ビル 9階

9th Floor, Taka-ai Building, 15-2, Nihonbashi 3-chome

Chuo-ku, Tokyo 103-0027 JAPAN

☐ 通知のためのあて名: 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す

## 第四欄 国際予備審査に対する基本事項

補正に関する記述: \*

1. 出願人は、次のものを基礎として国際予備審査を開始することを希望する。

☐ 出願時の国際出願を基礎とすること。

☐ 明細書に関して ☐ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

☐ 請求の範囲に関して ☐ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第19条の規定に基づいてなされた補正 (添付した説明書も含む) を基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

☐ 図面に関して ☐ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

2. ☐ 出願人は、特許協力条約第19条の規定に基づく請求の範囲に関する補正を差し替えることによって考慮されることを望む。

3. ☐ 出願人は、国際予備審査の開始が優先日から20月経過後まで延期されることを望む (ただし、国際予備審査機関が、特許協力条約第19条の規定に基づき行われた補正書の享しを受領、又は当該補正を希望しない旨の出願人からの通知を受領した場合を除く (規則 89.1(d)))。  
(この口は、特許協力条約第19条の規定に基づく期間が満了していない場合にのみ、レ印を付すことができる。)

\* 記入がない場合は、1) 補正がないか又は国際予備審査機関が補正 (原本又は享し) を受領していないときは、出願時の国際出願を基礎に予備審査が開始され、2) 国際予備審査機関が、見解書又は予備審査報告書の作成開始前に補正 (原本又は享し) を受領したときは、これらの補正を考慮して予備審査が開始又は続行される。

国際予備審査を行うための言語は 日本語 であり、

☒ 国際出願の提出時の言語である。

☐ 国際調査のために提出した翻訳文の言語である。

☐ 国際出願の公開の言語である。

☐ 国際予備審査の目的のために提出した翻訳文の言語である。

## 第五欄 国の選択

出願人は、選択資格のある全ての指定国 (即ち、既に出願人によって指定されており、かつ特許協力条約第II章に拘束されている国) を選択する。

ただし、出願人は次の国の選択を希望しない。: \_\_\_\_\_



## 第VI欄 照合欄

この国際予備審査請求書には、国際予備審査のために、第IVに記載する言語による書類が添付されている。

## 国際予備審査機関記入欄

受 領 未 受 領

- |  |   |                          |                          |
|--|---|--------------------------|--------------------------|
| 1. 国際出願の翻訳文 .....                                    | 枚 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2. 特許協力条約第34条の規定に基づく補正書 .....                        | 枚 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3. 特許協力条約第18条の規定に基づく補正書<br>(又は、要求された適合性翻訳文)の写し ..... | 枚 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 4. 特許協力条約第18条の規定に基づく説明書<br>(又は、要求された適合性翻訳文)の写し ..... | 枚 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 5. 書簡 .....  | 枚 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 6. その他 (書類名を具体的に記載する) :                              | 枚 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

この国際予備審査請求書には、さらに下記の書類が添付されている。

- |  |  |
|--|--|
| 1. <input checked="" type="checkbox"/> 手数料計算用紙                 | 3. <input type="checkbox"/> 包括委任状の写し               |
| <input checked="" type="checkbox"/> 添付した書類に相当する特許印紙を<br>貼付した書面 | 4. <input type="checkbox"/> 記名押印 (署名) に関する説明書      |
| <input checked="" type="checkbox"/> 国際事務局の口座への振込を証明する書面        | 5. <input type="checkbox"/> スクリーンショット又はマイクロfilm配列表 |
| 2. <input type="checkbox"/> 別個の記名押印された委任状                      | 6. <input type="checkbox"/> その他 (書類名を具体的に記載する) :   |

## 第VII欄 提出者の記名押印

各人の氏名 (名称) を記載し、その次に押印する。

佐 伯 憲 生



## 国際予備審査機関記入欄

1. 国際予備審査請求書の受理の日

2. 規則 80.1(b)の規定による国際予備審査請求書の受理の日の訂正後の日付

3. ☐ 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理。ただし、以下の4, 5の項目にはあてはまらない。

☐ 出願人に通知した。

4. ☐ 規則 80.5により延長が認められている優先日から19月の期間内の国際予備審査請求書の受理

5. ☐ 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理であるが規則82により認められる。

## 国際事務局記入欄

国際予備審査請求書の国際予備審査機関からの受領の日:



# 第 II 章

P C T

手 数 料 計 算 用 紙

国 際 予 備 審 査 請 求 書 の 附 属 書

国際予備審査機関記入欄

国際出願番号

P C T / J P 9 9 / 0 1 4 8 1

出願人又は代理人の書類記号

J A 9 0 8 1 5 5

国際予備審査機関の日付印

出願人

科学技術振興事業団

## 所定の手数料の計算

1. 特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律（国内法）  
第18条第1項第4号の規定による手数料  
（予備審査請求料）（注1）

2 8 , 0 0 0 円 P

2. 取扱手数料（注2）.....

1 9 , 6 0 0 円 H

3. 所定の手数料の合計

P及びHに記入した金額を加算し、合計額を合計に記入...

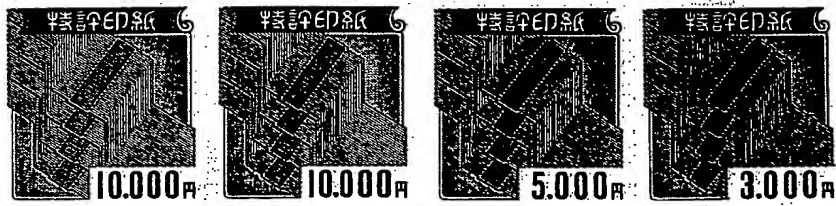
4 7 , 6 0 0 円

合 計

（注1） 法第18条第1項第4号の規定による手数料については、特許印紙をもって納付しなければならない。

（注2） 取扱手数料については、国際予備審査機関である日本国特許庁の長官が告示する国際事務局の口座への振り込みを証明する書面を提出することにより納付しなければならない。





予備審査請求手数料

28,000円





# ご利用明細

ご来店いただき  
ありがとうございます。

 東京三菱銀行

年月日	取扱店番	お取引内容
111018	0022	お振込
受付通番	銀行番号	支店番号
8355		
時刻	税込手数料	お取引金額
14:20	¥105*	¥19,600*
お取引できない場合	残高	
お取扱金額	万円	千円
2	0	0
ご案内	¥305*	1 0 0
お振込先は 東京三菱銀行 内幸町支店 普通 0473286 WIPO-PCT GENEVA様 ご依頼人は タクミツキヨシムサシ サエキ ノリ オ様 電話 0352052521		

取扱手数料

19,600円



特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁 (国際調査機関)



出願人代理人

佐伯 憲生

殿

あて名

〒 103-0027

東京都中央区日本橋3丁目15番2号

高愛ビル9階

たくみ特許事務所

PCT

国際調査報告又は国際調査報告を作成しない旨  
の決定の送付の通知書

(法施行規則第41条)  
〔PCT規則44.1〕

発送日  
(日.月.年)

06.07.99

出願人又は代理人  
の書類記号

JA908155

今後の手続きについては、下記1及び4を参照。

国際出願番号

PCT/J P99/01481

国際出願日  
(日.月.年)

24.03.99

出願人 (氏名又は名称)

科学技術振興事業団

1. ☒ 国際調査報告が作成されたこと、及びこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

PCT19条の規定に基づく補正書及び説明書の提出

出願人は、国際出願の請求の範囲を補正することができる (PCT規則46参照)。

いつ 補正書の提出期間は、通常国際調査報告の送付の日から2月である。

詳細については添付用紙の備考を参照すること。

どこへ 直接次の場所へ

The International Bureau of WIPO

34, chemin des Colombettes

1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

詳細な手続については、添付用紙の備考を参照すること。

2. ☐ 国際調査報告が作成されないこと、及び法第8条第2項 (PCT17条(2)(a)) の規定による国際調査報告を作成しない旨の決定をこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

3. ☐ 法施行規則第44条 (PCT規則40.2) に規定する追加手数料の納付に対する異議の申立てに関して、出願人に下記の点を通知する。

☐ 異議の申立てと当該異議についての決定を、その異議の申し立てと当該異議についての決定の両方を指定官庁へ送付することを求める出願人の請求とともに、国際事務局へ送付した。

☐ 当該異議についての決定は、まだ行われていない。決定されしだい出願人に通知する。

4. 今後の手続: 出願人は次の点に注意すること。

優先日から18月経過後、国際出願は国際事務局によりすみやかに国際公開される。出願人が公開の延期を望むときは、国際出願又は優先権の主張の取下げの通知がPCT規則90の2.1及び90の2.3にそれぞれ規定されているように、国際公開の事務的な準備が完了する前に国際事務局に到達しなければならない。

出願人が優先日から30月まで (官庁によってはもっと遅く) 国内段階の開始を延期することを望むときは、優先日から19月以内に、国際予備審査の請求書が提出されなければならない。

国際予備審査の請求書若しくは、後にする選択により優先日から19箇月以内に選択しなかった又は第II章に拘束されないため選択できなかったすべての指定官庁に対しては優先日から20月以内に、国内段階の開始のための所定手続を取らなければならない。

名称及びあて名

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特 許 庁 長 官

2 B

9 1 2 3

電話番号 03-3581-1101 内線 3235



## 注 意

1. 国際調査報告の発送日から起算する条約第19条(1)及び規則46.1に従う国際事務局への補正期間に注意してください。
2. 条約22条(2)に規定する期間に注意してください。
3. 文献の写しの請求について

国際調査報告に記載した文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することもできますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

### 〔申込方法〕

(1) 特許(実用新案・意匠)公報については、下記の点を明記してください。

○特許・実用新案及び意匠の種類

○出願公告又は出願公開の年次及び番号(又は特許番号、登録番号)

○必要部数

(2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

○国際調査報告の写しを添付してください(返却します)。

### 〔申込み及び照会先〕

〒135 東京都江東区東陽4-1-7 佐藤ダイヤビル

財団法人 日本特許情報機構 サービス課

TEL 03-5690-3900

注意 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。



## 様式PCT/ISA/220の備考

この備考は、PCT 19条の規定に基づく補正書の提出に関する基本的な指示を与えるためのものである。この備考は特許協力条約並びにこの条約に基づく規則及び実施細則の規定に基づいている。この備考とそれらの規定とが相違する場合には、後者が適用される。詳細な情報については、WIPOの出版物であるPCT出願人の手引も参照すること。

### PCT 19条の規定に基づく補正書の提出に関する指示

出願人は、国際調査報告を受領した後、国際出願の請求の範囲を補正する機会が一回ある。しかし、国際出願のすべての部分（請求の範囲、明細書及び図面）が、国際予備審査の手続においても補正できるもので、例えば出願人が仮保護のために補正書を公開することを希望する場合又は国際公開前に請求の範囲を補正する別の理由がある場合を除き、通常PCT 19条の規定に基づく補正書を提出する必要はないことを強調しておく。さらに、仮保護は一部の国のみで与えられるだけであることも強調しておく。

#### 補正の対象となるもの

PCT 19条の規定により請求の範囲のみ補正することができる。

国際段階においてPCT 34条の規定に基づく国際予備審査の手続において請求の範囲を（更に）補正することができる。

明細書及び図面は、PCT 34条の規定に基づく国際予備審査の手続においてのみ補正することができる。

国内段階に移行する際、PCT 28条（又はPCT 41条）の規定により、国際出願のすべての部分を補正することができる。

#### いつ

国際調査報告の送付の日から2月又は優先日から16月の内どちらか遅く満了するほうの期間内。しかし、その期間の満了後であっても国際公開の技術的な準備の完了前に国際事務局が補正を受領した場合には、その補正書は、期間内に受理されたものとみなすことを強調しておく（PCT規則46.1）。

#### 補正書を提出すべきところ

補正書は、国際事務局のみに提出でき、受理官庁又は国際調査機関には提出してはいけない（PCT規則46.2）。国際予備審査の請求書を提出した／する場合については、以下を参照すること。

#### どのように

1以上の請求の範囲の削除、1以上の新たな請求の範囲の追加、又は1以上の請求の範囲の記載の補正による。

差替え用紙は、補正の結果、出願当初の用紙と相違する請求の範囲の各用紙毎に提出する。

差替え用紙に記載されているすべての請求の範囲には、アラビア数字を付さなければならない。請求の範囲を削除する場合、その他の請求の範囲の番号を付け直す必要はない。請求の範囲の番号を付け直す場合には、連続番号で付け直さなければならない（PCT実施細則第205号(b)）。

補正は国際公開の言語で行う。

#### 補正書にどのような書類を添付しなければならないか

##### 書簡（PCT実施細則第205号(b)）

補正書には書簡を添付しなければならない。

書簡は国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開されることはない。これを「PCT 19条(1)に規定する説明書」と混同してはならない（「PCT 19条(1)に規定する説明書」については、以下を参照）。

書簡は、英語又は仏語を選択しなければならない。ただし、国際出願の言語が英語の場合、書簡は英語で、仏語の場合、書簡は仏語で記載しなければならない。

書簡には、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違について表示しなければならない。特に、国際出願に記載した各請求の範囲との関連で次の表示（2以上の請求の範囲についての同一の表示する場合は、まとめることができる。）をしなければならない。

- (i) この請求の範囲は変更しない。
- (ii) この請求の範囲は削除する。
- (iii) この請求の範囲は追加である。
- (iv) この請求の範囲は出願時の1以上の請求の範囲と差し替える。
- (v) この請求の範囲は出願時の請求の範囲の分割の結果である。





次に、添付する書簡中での、補正についての説明の例を示す。

1. [請求の範囲の一部の補正によって請求の範囲の項数が48から51になった場合] :  
“請求の範囲1-29、31、32、34、35、37-48項は、同じ番号のもとに補正された請求の範囲と置き換えられた。請求の範囲30、33及び36項は変更なし。新たに請求の範囲49-51項が追加された。”
2. [請求の範囲の全部の補正によって請求の範囲の項数が15から11になった場合] :  
“請求の範囲1-15項は、補正された請求の範囲1-11項に置き換えられた。”
3. [原請求の範囲の項数が14で、補正が一部の請求の範囲の削除と新たな請求の範囲の追加を含む場合] :  
“請求の範囲1-6及び14項は変更なし。請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。”又は  
“請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。その他の全ての請求の範囲は変更なし。”
4. [各種の補正がある場合] :  
“請求の範囲1-10項は変更なし。請求の範囲11-13、18及び19項は削除。請求の範囲14、15及び16項は補正された請求の範囲14項に置き換えられた。請求の範囲17項は補正された請求の範囲15、16及び17項に分割された。新たに請求の範囲20及び21項が追加された。”

“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”(PCT規則46.4)

補正書には、補正並びにその補正が明細書及び図面に与える影響についての説明書を提出することができる(明細書及び図面はPCT19条(1)の規定に基づいては補正できない)。

説明書は、国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開される。

説明書は、国際公開の言語で作成しなければならない。

説明書は、簡潔でなければならない、英語の場合又は英語に翻訳した場合に500語を越えてはならない。

説明書は、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違を示す書簡と混同してはならない。説明書を、その書簡に代えることはできない。説明書は別紙で提出しなければならない、見出しを付すものとし、その見出しは“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”の語句を用いることが望ましい。

説明書には、国際調査報告又は国際調査報告に列記された文献との関連性に関して、これらを誹謗する意見を記載してはならない。国際調査報告に列記された特定の請求の範囲に関連する文献についての言及は、当該請求の範囲の補正に関してのみ行うことができる。

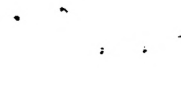
国際予備審査の請求書が提出されている場合

PCT19条の規定に基づく補正書及び添付する説明書の提出の時に国際予備審査の請求書が既に提出されている場合には、出願人は、補正書(及び説明書)を国際事務局に提出すると同時にその写し及び必要な場合、その翻訳文を国際予備審査機関にも提出することが望ましい(PCT規則55.3(a)、62.2の第1文を参照)。詳細は国際予備審査請求書(PCT/IPEA/401)の注意書参照。

国内段階に移行するための国際出願の翻訳に関して

国内段階に移行する際、PCT19条の規定に基づいて補正された請求の範囲の翻訳を出願時の請求の範囲の翻訳の代わりに又は追加して、指定官庁/選択官庁に提出しなければならないこともあるので、出願人は注意されたい。

指定官庁/選択官庁の詳細な要求については、PCT出願人の手引きの第II巻を参照。



P C T

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]



出願人又は代理人 の書類記号 JA908155	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/01481	国際出願日 (日.月.年) 24.03.99	優先日 (日.月.年) 24.03.98
出願人(氏名又は名称) 科学技術振興事業団		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 5 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☒ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ° A01H 5/00, C12N 15/09, C12N 15/31

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ° A01H 5/00, C12N 15/09, C12N 15/31

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS, DDBJ, DDBJ new, GenBank new, EMBL new, GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Hideya Fujimoto et al., BIO/TECHNOLOGY, vol. 11, p. 1151-1155 (1993) (13)	1, 5, 8, 13, 15-18, 21 2-4, 6, 7, 9-14, 19, 20
X Y	Frederick J. Perlak et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 88, p. 3324-3328 (1991) (32)	1, 5, 8, 14-18, 21 2-4, 6, 7, 9-13 19, 20

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22.06.99

国際調査報告の発送日

06.07.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長井 啓子



2B

9123

電話番号 03-3581-1101 内線 3236



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Rina Iannaccone et al., Plant Mol. Biol., vol. 34, p. 485-496 (1997)	1, 5, 8, 15-18, 21 2-4, 6, 7, 9-14 19, 20
X Y	Pamaela J. Green, Plant Physiol., vol. 102, p. 1065-1070 (1993)	1, 5, 8, 15-18, 21 2-4, 6, 7, 9-14 19, 20
Y	Dancis A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 89, p. 3869-3873 (1992) (9)	20
Y	Johnston M. et al., NATURE, vol. 387 (6632 Suppl), p. 87-90 (1997)	20
A	Brian Keith et al., The EMBO Journal, vol. 5, p. 2419-2425 (1986)	1-21





特許協力条約に基づく国際出願

願 書

出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

国際出願番号

国際出願日

(受付印)

出願人又は代理人の書類記号  
(希望する場合、最大12字)

JA908155



第I欄 発明の名称

植物を形質転換する方法及びその植物並びにその遺伝子

第II欄 出願人

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

科学技術振興事業団

JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION

〒332-0012 日本国埼玉県川口市本町四丁目1番8号

1-8, Honcho 4-chome, Kawaguchi-shi, Saitama,

332-0012 JAPAN

☐ この欄に記載した者は、  
発明者でもある。

電話番号:

ファクシミリ番号:

加入電話番号:

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である:

☐

すべての指定国

☒

米国を除くすべての指定国

☐

米国のみ

☐

追記欄に記載した指定国

第III欄 その他の出願人又は発明者

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

森 敏

MORI Satoshi

〒275-0026 日本国千葉県習志野市谷津6-7-2-301

6-7-2-301, Yatsu, Narashino-shi, Chiba-ken,

275-0026 JAPAN

この欄に記載した者は、  
次に該当する:

☐

出願人のみである。

☒

出願人及び発明者である。

☐

発明者のみである。  
(ここにレ印を付したとき  
は、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である:

☐

すべての指定国

☐

米国を除くすべての指定国

☒

米国のみ

☐

追記欄に記載した指定国

☒ その他の出願人又は発明者が続表に記載されている。

第IV欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

次に記載された者は、国際機関において出願人のために行動する:

☒

代理人

☐

共通の代表者

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

10266 弁理士 佐伯 憲生 SAEKI Norio

〒103-0027 日本国東京都中央区日本橋三丁目15番2号

高愛ビル 9階

9th Floor, Taka-ai Building, 15-2, Nihonbashi 3-chome

Chuo-ku, Tokyo 103-0027 JAPAN

電話番号:

03-5205-2521

ファクシミリ番号:

03-5205-2522

加入電話番号:

☐ 通知のためのあて名: 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す



## 第 III 欄の続き その他の出願人又は発明者

この続表を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

中西 啓仁 NAKANISHI Hiromi

〒113-0032 日本国東京都文京区弥生 1-1-1

1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。
- ☒ 出願人及び発明者である。
- ☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

大木 宏之 OKI Hiroyuki

〒113-0032 日本国東京都文京区弥生 1-1-1

1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。
- ☒ 出願人及び発明者である。
- ☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

山口 博隆 YAMAGUCHI Hirotaka

〒113-0032 日本国東京都文京区弥生 1-1-1

1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。
- ☒ 出願人及び発明者である。
- ☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。
- ☐ 出願人及び発明者である。
- ☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名):

住所 (国名):

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☐ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国☐ その他の出願人又は発明者が他の続表に記載されている。



第V欄 国の指定

規則 4.9(a)の規定に基づき次の指定を行う (該当する□にレ印を付すこと; 少なくとも1つの□にレ印を付すこと)。

広域特許

- ☐ AP ARIPO特許: GH ガーナ Ghana, GM ガンビア Gambia, KE ケニア Kenya, LS レソト Lesotho, MW マラウイ Malawi, SD スーダン Sudan, SZ スワジランド Swaziland, UG ウガンダ Uganda, ZW ジンバブエ Zimbabwe, 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締結国である他の国
- ☐ EA ユーラシア特許: AM アルメニア Armenia, AZ アゼルバイジャン Azerbaijan, BY ベラルーシ Belarus, KG キルギス Kyrgyzstan, KZ カザフスタン Kazakhstan, MD モルドヴァ Republic of Moldova, RU ロシア Russian Federation, TJ タジキスタン Tajikistan, TM トルクメニスタン Turkmenistan, 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締結国である他の国
- ☒ EP ヨーロッパ特許: AT オーストリア Austria, BE ベルギー Belgium, CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein, CY キプロス Cyprus, DE ドイツ Germany, DK デンマーク Denmark, ES スペイン Spain, FI フィンランド Finland, FR フランス France, GB 英国 United Kingdom, GR ギリシャ Greece, IE アイルランド Ireland, IT イタリア Italy, LU ルクセンブルグ Luxembourg, MC モナコ Monaco, NL オランダ Netherlands, PT ポルトガル Portugal, SE スウェーデン Sweden, 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締結国である他の国
- ☐ OA OAPI 特許: BF ブルキナ・ファソ Burkina Faso, BJ ベナン Benin, CF 中央アフリカ Central African Republic, CG コンゴ Congo, CI コートジボアール Côte d'Ivoire, CM カメルーン Cameroon, GA ガボン Gabon, GN ギニア Guinea, ML マリ Mali, MR モリタニア Mauritania, NE ニジェール Niger, SN セネガル Senegal, TD チャード Chad, TG トーゴ Togo, 及びアフリカ知的財産機構のメンバー国と特許協力条約の締結国である他の国 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する)

国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する)

- |   |   |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> AL アルバニア Albania                                       | <input type="checkbox"/> LT リトアニア Lithuania   |
| <input type="checkbox"/> AM アルメニア Armenia                                       | <input type="checkbox"/> LU ルクセンブルグ Luxembourg  |
| <input type="checkbox"/> AT オーストリア Austria                                      | <input type="checkbox"/> LV ラトヴィア Latvia  |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU オーストラリア Australia                        | <input type="checkbox"/> MD モルドヴァ Republic of Moldova                                   |
| <input type="checkbox"/> AZ アゼルバイジャン Azerbaijan                                 | <input type="checkbox"/> MG マダガスカル Madagascar   |
| <input type="checkbox"/> BA ボスニア・ヘルツェゴヴィナ Bosnia and Herzegovina                | <input type="checkbox"/> MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input type="checkbox"/> BB バルバドス Barbados                                      | <input type="checkbox"/> MN モンゴル Mongolia   |
| <input type="checkbox"/> BG ブルガリア Bulgaria                                      | <input type="checkbox"/> MW マラウイ Malawi   |
| <input type="checkbox"/> BR ブラジル Brazil   | <input type="checkbox"/> MX メキシコ Mexico   |
| <input type="checkbox"/> BY ベラルーシ Belarus                                       | <input type="checkbox"/> NO ノルウェー Norway  |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA カナダ Canada                               | <input type="checkbox"/> NZ ニュー・ジーランド New Zealand                                       |
| <input type="checkbox"/> CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein | <input type="checkbox"/> PL ポーランド Poland  |
| <input type="checkbox"/> CN 中国 China  | <input type="checkbox"/> PT ポルトガル Portugal  |
| <input type="checkbox"/> CU キューバ Cuba   | <input type="checkbox"/> RO ルーマニア Romania   |
| <input type="checkbox"/> CZ チェッコ Czech Republic                                 | <input type="checkbox"/> RU ロシア Russian Federation                                      |
| <input type="checkbox"/> DE ドイツ Germany   | <input type="checkbox"/> SD スーダン Sudan  |
| <input type="checkbox"/> DK デンマーク Denmark                                       | <input type="checkbox"/> SE スウェーデン Sweden   |
| <input type="checkbox"/> EE エストニア Estonia                                       | <input type="checkbox"/> SG シンガポール Singapore  |
| <input type="checkbox"/> ES スペイン Spain  | <input type="checkbox"/> SI スロヴェニア Slovenia   |
| <input type="checkbox"/> FI フィンランド Finland                                      | <input type="checkbox"/> SK スロヴァキア Slovakia   |
| <input type="checkbox"/> GB 英国 United Kingdom                                   | <input type="checkbox"/> SL シエラ・レオネ Sierra Leone  |
| <input type="checkbox"/> GE グルジア Georgia  | <input type="checkbox"/> TJ タジキスタン Tajikistan   |
| <input type="checkbox"/> GH ガーナ Ghana   | <input type="checkbox"/> TM トルクメニスタン Turkmenistan                                       |
| <input type="checkbox"/> GM ガンビア Gambia   | <input type="checkbox"/> TR トルコ Turkey  |
| <input type="checkbox"/> GW ギニア・ビサウ Guinea-Bissau                               | <input type="checkbox"/> TT トリニダード・トバゴ Trinidad and Tobago                              |
| <input type="checkbox"/> HR クロアチア Croatia                                       | <input type="checkbox"/> UA ウクライナ Ukraine   |
| <input type="checkbox"/> HU ハンガリー Hungary                                       | <input type="checkbox"/> UG ウガンダ Uganda   |
| <input type="checkbox"/> ID インドネシア Indonesia                                    | <input checked="" type="checkbox"/> US 米国 United States of America                      |
| <input type="checkbox"/> IL イスラエル Israel  | <input type="checkbox"/> UZ ウズベキスタン Uzbekistan  |
| <input type="checkbox"/> IS アイスランド Iceland                                      | <input type="checkbox"/> VN ヴィエトナム Viet Nam   |
| <input type="checkbox"/> JP 日本 Japan  | <input type="checkbox"/> YU ユーゴスラヴィア Yugoslavia   |
| <input type="checkbox"/> KE ケニア Kenya   | <input type="checkbox"/> ZW ジンバブエ Zimbabwe  |
| <input type="checkbox"/> KG キルギス Kyrgyzstan                                     |   |
| <input type="checkbox"/> KR 韓国 Republic of Korea                                |   |
| <input type="checkbox"/> KZ カザフスタン Kazakhstan                                   |   |
| <input type="checkbox"/> LC セント・ルシア Saint Lucia                                 |   |
| <input type="checkbox"/> LK スリ・ランカ Sri Lanka                                    |   |
| <input type="checkbox"/> LR リベリア Liberia  |   |
| <input type="checkbox"/> LS レソト Lesotho   |   |

以下の□は、この様式の施行後に特許協力条約の締結国となった国を指定 (国内特許のために) するためのものである

- ☐
- ☐
- ☐
- ☐
- ☐

確認の指定の宣言: 出願人は、上記の指定に加えて、規則 4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約の下で認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、この宣言から除外の表示を追記欄にした国は、指定から除かれる。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。 (指定の確認は、指定を特許する通知の提出と指定手数料及び確認手数料の納付からなる。この確認は、優先日から15月以内に受理官庁へ提出しなければならない。)



第VI欄 優先権主張 他優先権の主張（先の出願）が追記欄に記載されている。

先の出願日 (日. 月. 年)	先の出願番号	先の出願		
		国内出願 : 国名	広域出願 : *広域官庁名	国際出願 : 受理官庁名
(1) 24.03.98	平成10年特許願 第96637号	日本国 JAPAN		
(2)				
(3)				

☒ 上記( )の番号の先の出願（ただし、本国際出願が提出される受理官庁に対して提出されたものに限る）のうち、次の( )の番号のものについては、出願書類の録証原本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁（日本国特許庁の長官）に対して請求している。

(1)

\*先の出願が、ARIPOの特許出願である場合には、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を追記欄に表示しなければならない（規則4.10(b)(ii)）。追記欄を参照。

第VII欄 国際調査機関

国際調査機関（ISA）の選択

先の調査結果の利用請求：当該調査の照会（先の調査が、国際調査機関によって既に実施又は請求されている場合）

出願日（日. 月. 年）

出願番号

国名（又は広域官庁）

ISA/JIP

第VIII欄 照合欄：出願の書面

この国際出願の用紙の枚数は次のとおりである。

願書 ..... 4 枚  
 明細書（配列表を除く）..... 33 枚  
 請求の範囲 ..... 2 枚  
 要約書 ..... 1 枚  
 図面 ..... 18 枚  
 明細書の配列表 ..... 22 枚  
 合計 ..... 80 枚

この国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。

- ☒ 手数料計算用紙
- ☒ 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面
- ☒ 国際事務局の口座への振込みを証明する書面
- ☐ 別個の記名押印された委任状
- ☐ 包括委任状の写し
- ☐ 記名押印（署名）の説明書
- ☐ 優先権書類（上記第VI欄の( )の番号を記載する）
- ☐ 国際出願の翻訳文（翻訳に使用した言語名を記載する）
- ☐ 寄託した微生物又は他の生物材料に関する書面
- ☒ スク레オチド又はアミノ酸配列表（フレキシブルディスク）
- ☒ その他（書類名を詳細に記載する）

陳述書  
 プレザンテーションの記録形式とイノベーションを促進する  
 優先権書類送付請求書

要約書とともに提示する図面：

本国際出願の使用言語名： 日本語

第IX欄 提出者の記名押印

各人の氏名（名称）を記載し、その次に押印する。

佐伯憲生



受理官庁記入欄

1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日	2. 図面 <input type="checkbox"/> 受理された <input type="checkbox"/> 不足図面がある
3. 国際出願として提出された書類を補充する書類又は図面であって その後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）	
4. 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補充の期間内の受理の日	
5. 出願人により特定された 国際調査機関 ISA/JIP	
8. <input type="checkbox"/> 調査手数料未払いにつき、国際調査機関に 調査用写しを送付していない	

国際事務局記入欄

記録原本の受理の日





P C T

手数料計算用紙

願書附属書

受理官庁記入欄

国際出願番号

出願人又は代理人の書類記号

JA908155

受理官庁の日付印

出願人

科学技術振興事業団

## 所定の手数料の計算

1. 及び2. 特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律（国内法）  
第18条第1項第1号の規定による手数料（注1）  
（送付手数料【T】及び調査手数料【S】の合計）

95,000 円 T+S

## 3. 国際手数料（注2）

基本手数料

国際出願に含まれる用紙の枚数 80 枚

最初の30枚まで

54,800 円 b1

50 × 1,300 =

65,000 円 b2

30枚を超える用紙の枚数 用紙1枚の手数料

b1及びb2に記入した金額を加算し、合計額をBに記入

119,800 円 B

指定手数料

国際出願に含まれる指定数（注3） 4

4 × 12,600 =

50,400 円 D

支払うべき指定手数料  
の数（上限は11）  
（注4） 1 指定当たりの手数料  
（円）

B及びDに記入した金額を加算し、合計額をIに記入

170,200 円 I

## 4. 納付すべき手数料の合計

T+S及びIに記入した金額を加算し、合計額を合計に記入

265,200 円

合 計

（注1）送付手数料及び調査手数料については、合計金額を特許印紙をもって納付しなければならない。

（注2）国際手数料については、受理官庁である日本国特許庁の長官が告示する国際事務局の口座への振込みを証明する書面を提出することにより納付しなければならない。

（注3）願書第V欄でレ印を付した口の数。

（注4）指定数を記入する。ただし、11指定以上は一律11とする。



陳述書



特許庁長官 伊佐山 健志殿

本書に添付したフレキシブルディスクに記録した塩基配列またはアミノ酸配列は、明細書に記載した塩基配列またはアミノ酸配列を忠実にコード化したものであって、内容を変更したものでないことを陳述します。

平成 11 年 03 月 24 日

国際出願の表示      24. 03. 99 提出の国際出願  
出願人又は代理人の書類番号      J A 9 0 8 1 5 5

発明の名称      植物を形質転換する方法及びその植物並びにその遺伝子

代理人      (10266) 弁理士      佐伯 憲生


SAEKI Norio





フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面



1. 出願人名称      科学技術振興事業団  
Japan Science and Technology Corporation
2. 代理人氏名      佐伯 憲生    SAEKI Norio 
3. 国際出願の表示    24. 03. 99 提出の国際出願  
出願人又は代理人の書類番号      J A 9 0 8 1 5 5
4. 発明の名称      植物を形質転換する方法及びその植物並びにその遺伝子
5. 使用した文字列コード J I S コード
6. 配列を記載したファイル名  
J A 9 0 8 1 5 5 . T X T
7. 連絡先  
    電話番号      0 3 ( 5 2 0 5 ) 2 5 2 1  
    担当者氏名      佐伯 憲生





優先権書類送付請求書

特許庁長官 伊佐山 建志殿

1. 国際出願の表示      24.03.99提出の国際出願  
出願人又は代理人の書類記号    J A 9 0 8 1 5 5

2. 優先権の主張の基礎となる出願の表示

平成10年特許願第96637号

3. 出 願 人  
名 称

科学技術振興事業団  
Japan Science and Technology Corporation

あて名

〒332-0012 埼玉県川口市本町四丁目1番8号  
1-8, Honcho 4-chome, Kawaguchi-shi, Saitama-Ken  
332-0012 JAPAN

国 籍

日本国      J A P A N

住 所

日本国      J A P A N

4. 代 理 人  
氏 名

(10266) 弁理士 佐 伯 憲

S A E K I N O



あて名

〒103-0027 日本国東京都中央区日本橋三丁目  
15番2号 高愛ビル 9階  
9th Floor, Taka-ai Bldg., 15-2, Nihonbashi 3-chome,  
Chuo-ku, Tokyo 103-0027 JAPAN

5. 添付書類の目録

平成10年特許願第96637号





## ご利用明細

本日はご来店いただきありがとうございます。

年月日	時刻	取扱店番	銀行番号	支店番号	口座番号	印紙税申告納付につき趣向税務署承認済
11032011	20022					
お取引内容	お取引金額	お取引場所	残高	お取扱金額		
お振込	¥170,200*		おつり	¥538*		
ご案内				<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <span>500円</span> <span>100円</span> <span>50円</span> <span>10円</span> <span>5円</span> <span>1円</span> </div>		
<p>お受取人 東京三菱銀行 内幸町支店 普通 0473286 WIPO-PCT GENEVA 様</p> <p>ご依頼人 タクミトツキョ サエキノリオ 様 03-5205-2521</p> <p>税込手数料 262円を いただきました</p>						

かわいい人形も貯まっていくな  
ベストパートナーサービス  
ディズニーキャラクターズプラン

詳しくは  
裏面へ！

- 残高の金額は決済未結の証券類を含んでいます。
- 残高の額部に「-」がある場合は、お借入れ残高を意味します。



東京三菱銀行



基本手数料	119,800円
指定手数料	50,400円
合 計	170,200円



優先権証明願 (P C T)



特許庁長官 伊佐山 建志 殿

1. 出願番号 平成10年特許願第96637号

2. 請求人

識別番号 100102668

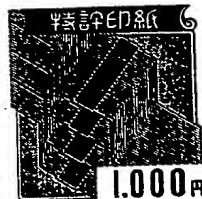
住 所 〒103-0027 日本国東京都中央区日本橋三丁目  
15番2号  
高愛ビル 9階

氏 名 弁理士 佐伯憲生



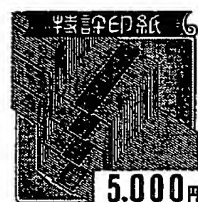
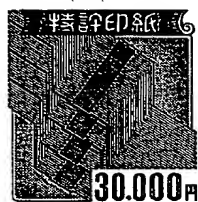
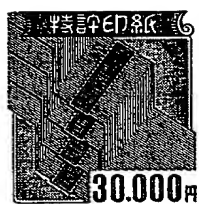
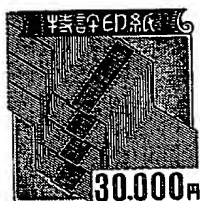
電話番号 03(5205)2521

3. 出願国名 P C T



(1,500円)





送付手数料・調査手数料 95,000円



34708151



## 手続補正書

(法第6条の規定による命令に基づく補正)

特許庁長官 伊佐山 建志殿

1. 国際出願の表示 PCT/J P 99/01481

2. 出 願 人

名 称

科学技術振興事業団

Japan Science and Technology Corporation

あて名

〒332-0012 日本国埼玉県川口市本町四丁目1  
番8号

1-8, Honcho 4-chome, Kawaguchi-shi, Saitama-Ken 332-0012

JAPAN

国 籍

日本国 J A P A N

住 所

日本国 J A P A N

3. 代 理 人

氏 名

(10266) 弁理士 佐伯 憲 生

SAEKI Norio



あて名

〒103-0027 日本国東京都中央区日本橋3丁目  
15番2号 高愛ビル 9階

9th Floor, Taka-ai Bldg., 15-2, Nihonbashi 3-chome,

Chuo-ku, Tokyo 103-0027 JAPAN

4. 補正命令の日付 06.04.99

5. 補正の対象 代理権を証明する書面

6. 補正の内容 別紙のとおり

7. 添付書類の目録 代理権を証明する書面 2通





# 委任状

1999年3月28日

私儀

弁理士 (10266) 佐伯 憲生 氏

を以て代理人と定め、下記の権限を委任します。

1. 特許協力条約に基づく国際出願

「植物を形質転換する方法及びその植物並びにその遺伝子」  
に関する一切の件

2. 上記出願及び指定国の指定を取り下げる件

3. 上記出願についての国際予備審査の請求に関する一切の件並びに請求及び  
選択国の選択を取り下げる件

あて名 東京都文京区弥生 1-1-1

氏 名 中西 啓仁



あて名 東京都文京区弥生 1-1-1

氏 名 大木 宏之



あて名 東京都文京区弥生 1-1-1

氏 名 山口 博隆





# 委 任 状

1999年3月28日

私儀

弁理士 (10266) 佐伯憲生氏

を以て代理人と定め、下記の権限を委任します。

1. 特許協力条約に基づく国際出願

「植物を形質転換する方法及びその植物並びにその遺伝子」  
に関する一切の件

2. 上記出願及び指定国の指定を取り下げる件

3. 上記出願についての国際予備審査の請求に関する一切の件並びに請求及び  
選択国の選択を取り下げる件

あて名 千葉県習志野市谷津6-7-2-301

氏 名 森 敏





# 委 任 状

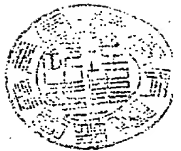
1999年 4 月 9 日

私儀 弁理士 佐伯 憲生氏を代理人と定めて、下記の権限を委任します。

## 1. 特許協力条約に基づく出願

「植物と形質転換する方法及びその植物並びにその遺伝子」

に関する一切の件



## 2. 上記出願及び指定国の指定を取り下げる件

## 3. 上記出願についての国際予備審査の請求に関する一切の件並びに請求及び選択国の選択を取り下げる件

埼玉県川口市本町四丁目1番8号

科学技術振興事業団

理事長 中 村 守 孝





P C T

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
〔PCT36条及びPCT規則70〕

REC'D 25 APR 2000

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 JA908155	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/01481	国際出願日 (日.月.年) 24.03.99	優先日 (日.月.年) 24.03.98
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. 7 A01H 5/00, C12N 15/09, C12N 15/31		
出願人 (氏名又は名称) 科学技術振興事業団		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。  
☒ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で 1 ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
  - ☒ 国際予備審査報告の基礎
  - ☐ 優先権
  - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
  - ☐ 発明の単一性の欠如
  - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
  - ☐ ある種の引用文献
  - ☐ 国際出願の不備
  - ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 20.10.99	国際予備審査報告を作成した日 07.04.00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 長 井 啓 子	2 B 9 1 2 3
	電話番号 03-3581-1101 内線 3236	

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1998年7月)





## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

- ☒ 明細書 第 1-33 ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☒ 請求の範囲 第 2, 6, 8-21 項、 出願時に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
請求の範囲 第 1, 5, 7 項、 03.04.00 付の書簡と共に提出されたもの
- ☒ 図面 第 1-18 ページ/図、 出願時に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☒ 明細書の配列表の部分 第 1-22 ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☒ 請求の範囲 第 3, 4 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)

請求の範囲 1, 2, 5-21 有  
請求の範囲 無

進歩性(IS)

請求の範囲 1, 2, 5-21 有  
請求の範囲 無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲 1, 2, 5-21 有  
請求の範囲 無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1, 2及び5-21について

国際調査報告で引用した文献を含むいずれの文献にも、導入される他の遺伝子がコードする蛋白質が有する機能を実質的に変更することなく、8塩基以上連続したG又はTのみの配列を含まず、かつ当該他の遺伝子の塩基配列中のGT-リッチな塩基配列の下流側に存在するNATAAA、ANTAAA、ANAAAA、AATNAA、AATANAA、又は、AATAAN(塩基配列中のNは任意の塩基を示す。)で示されるいずれの塩基配列も含まないように設計してなる他の種の遺伝子を導入して植物を形質転換することについては、記載も示唆もされていない。植物に上記のように設計してなる他の遺伝子を導入することにより、当該他の遺伝子が十分に発現することは、当業者にとって自明ではない。



請 求 の 範 囲

1. (補正後) 有用植物に他の種の遺伝子を導入して有用植物を形質転換する方法において、導入される他の遺伝子がコードする蛋白質が有する機能を実質的に変更することなく、8塩基以上連続したG又はTのみの配列を含まず、かつ当該他の遺伝子の塩基配列中のGT-リッチな塩基配列の下流側に存在するNATAAA、ANTAAA、AANAAA、AATNAA、AATANA、又は、AATAAN(塩基配列中のNは任意の塩基を示す。)で示されるいずれの塩基配列も含まないように設計することを特徴とする有用植物を形質転換する方法。
2. 導入される他の種の遺伝子が、酵母由来のものである請求の範囲第1項に記載の方法。
3. (削除)
4. (削除)
5. (補正後) mRNAのポリ(A)付加に関する要素の領域の塩基配列の改変が、形質転換される有用植物のコドン利用率に基づいて行われる請求の範囲第1～2項のいずれかに記載の方法。
6. 塩基配列の改変が、塩基のG及びTが豊富な領域が少なくなるように行われることを特徴とする請求の範囲第1～5項のいずれかに記載の方法。
7. (補正後) さらに、導入される遺伝子の全領域にわたって塩基のG及びCの含有量の差が少ないことを特徴とする請求の範囲第1～6項のいずれかに記載の方法。
8. 塩基配列の改変が、ATTTA配列を有さないように行われることを特徴とする請求の範囲第1～7項のいずれかに記載の方法。
9. 導入される遺伝子の開始コドンの上流に、コザック配列(Kozak配列)を有することを特徴とする請求の範囲第1～8項のいずれかに記載の方法。
10. 導入される遺伝子が、栄養分の吸収に関与する蛋白質をコードするものである請求の範囲第1～9項のいずれかに記載の方法。
11. 導入される遺伝子が、三価鉄還元酵素FRE1をコードする遺伝子である





P.B.5818 - Patentlaan 2  
2280 HV Rijswijk (ZH)  
☎ +31 70 340 2040  
TX 31651 epo nl  
FAX +31 70 340 3016

Europäisch s  
Patentamt

Zweigstelle  
in Den Haag  
Recherchen-  
abteilung

European  
Pat nt Office

Branch at  
The Hague  
Search  
division

Offic europ en  
des br v ts

Département à  
La Haye  
Division de la  
recherche

Cresswell, Thomas Anthony  
J.A. KEMP & CO.  
14 South Square  
Gray's Inn  
London WC1R 5JQ  
GRANDE BRETAGNE

J.A. KEMP & Co.

Rec'd. 06 JUN 2002

Action by.....

Datum/Date

06.06.02

Zeichen/Ref./Réf.

N.80284 AB

Anmeldung Nr./Application No./Demande n°/Patent Nr./Patent No./Brevet n°.

99910676.8-2406-JP9901481

Anmelder/Applicant/Demandeur/Patentinhaber/Proprietor/Titulaire

Japan Science and Technology Corporation

## COMMUNICATION

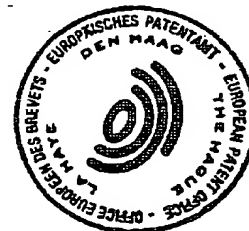
The European Patent Office herewith transmits as an enclosure the European search report for the above-mentioned European patent application.

If applicable, copies of the documents cited in the European search report are attached.

☒ Additional set(s) of copies of the documents cited in the European search report is (are) enclosed as well.

## REFUND OF THE SEARCH FEE

If applicable under Article 10 Rules relating to fees, a separate communication from the Receiving Section on the refund of the search fee will be sent later.









DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.6)
X	EP 0 385 962 A (MONSANTO CO) 5 September 1990 (1990-09-05) * page 8, line 19 - page 9, line 13; claim 15 *	1, 3-7, 10	A01H5/00 C12N15/09 C12N15/31
Y	ROTHNIE HELEN M: "Plant mRNA 3'-end formation." PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 32, no. 1-2, 1996, pages 43-61, XP001022098 ISSN: 0167-4412 * page 49, right-hand column, paragraph 2 - page 50, right-hand column, paragraph 2 *	1-10	
Y	LI QINGSHUN ET AL: "The polyadenylation of RNA in plants." PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE), vol. 115, no. 2, 1997, pages 321-325, XP001022094 ISSN: 0032-0889 * the whole document *	1-10	
Y	VAN DER SALM THEO ET AL: "Insect resistance of transgenic plants that express modified Bacillus thuringiensis cryIA(b) and cryIC genes: A resistance management strategy." PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 26, no. 1, 1994, pages 51-59, XP001029215 ISSN: 0167-4412 * abstract *	1-10	
			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.6)
			C12N
The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.			
Place of search MUNICH		Date of completion of the search 23 May 2002	Examiner Bilang, J
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS			
X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document			

1  
EPO FORM 1503 03.82 (P04C04)





DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT									
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.CI.6)						
P,Y	DIEHN SCOTT H ET AL: "Premature polyadenylation at multiple sites within a Bacillus thuringiensis toxin gene-coding region." PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE), vol. 117, no. 4, August 1998 (1998-08), pages 1433-1443, XP002199804 ISSN: 0032-0889 * the whole document *	1-10							
P,X	OKI HIROYUKI ET AL: "Introduction of the reconstructed yeast ferric reductase gene, refrel, into tobacco." PLANT AND SOIL, vol. 215, no. 2, 1999, pages 211-220, XP001021223 ISSN: 0032-079X * the whole document *	1-5,8-10							
			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.CI.6)						
The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.									
Place of search MUNICH		Date of completion of the search 23 May 2002	Examiner Bilang, J						
<table border="0"><tr><td>CATEGORY OF CITED DOCUMENTS</td><td>T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons ----- &amp; : member of the same patent family, corresponding document</td></tr><tr><td>X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document</td><td></td><td></td><td></td></tr></table>				CATEGORY OF CITED DOCUMENTS	T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons ----- & : member of the same patent family, corresponding document	X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document			
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS	T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons ----- & : member of the same patent family, corresponding document								
X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document									

1  
EPO FORM 1503 03 82 (P04C04)



**ANNEX TO THE EUROPEAN SEARCH REPORT  
ON EUROPEAN PATENT APPLICATION NO.**

EP 99 91 0676

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned European search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

23-05-2002

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0385962      A	05-09-1990	AT      206462 T	15-10-2001
		AU      638438 B2	01-07-1993
		AU      5163090 A	26-09-1990
		BR      9007159 A	10-12-1991
		CA      2024811 A1	25-08-1990
		DE      69033816 D1	08-11-2001
		DK      413019 T3	12-11-2001
		EP      1103616 A2	30-05-2001
		EP      0385962 A1	05-09-1990
		EP      0413019 A1	20-02-1991
		ES      2164633 T3	01-03-2002
		FI      107430 B1	15-08-2001
		IL      93513 A	14-11-1995
		JP      3504333 T	26-09-1991
		NO      303546 B1	27-07-1998
		NZ      232654 A	23-12-1991
		RU      2107725 C1	27-03-1998
		WO      9010076 A1	07-09-1990
		US      5880275 A	09-03-1999
		US      5500365 A	19-03-1996
		ZA      9001417 A	30-01-1991
		TR      24354 A	01-09-1991

---



Applicant's or agent's file reference JA908155	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/01481	International filing date (day/month/year) 24 March 1999 (24.03.99)	Priority date (day/month/year) 24 March 1998 (24.03.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A01H 5/00, C12N 15/09, 15/31		
Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>1</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 20 October 1999 (20.10.99)	Date of completion of this report 07 April 2000 (07.04.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

1977-1978

1978-1979

1979-1980

1980-1981



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/01481

RECEIVED

FEB 05 2001

TECH CENTER 1600/2900

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
pages 1-33, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims:  
pages 2,6,8-21, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages 1,5,7, filed with the letter of 03 April 2000 (03.04.2000)
- ☒ the drawings:  
pages 1-18, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the sequence listing part of the description:  
pages 1-22, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☒ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☒ the claims, Nos. 3,4
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/JP 99/01481**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1, 2, 5-21	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1, 2, 5-21	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1, 2, 5-21	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

Claims 1, 2 and 5-21

None of the documents cited in the international search report describes or suggests the transformation of a plant by introducing a gene of another species designed such that said other gene does not contain any sequences of 8 or more nucleotides consisting of G or T alone and does not include any of the nucleotide sequences NATAAA, ANTAAA, AANAAA, AATNAA, AATANA or AATAAN (where N in the nucleotide sequence represents any nucleotide) downstream from a GT-rich nucleotide sequence, without substantially altering the functions of the protein coded by the other gene that is introduced. Nor is it obvious to a person skilled in the art that when a foreign gene designed as above is introduced into a plant said foreign gene will be fully expressed.



P C T



国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)

[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 JA908155	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/01481	国際出願日 (日.月.年) 24.03.99	優先日 (日.月.年) 24.03.98
出願人(氏名又は名称) 科学技術振興事業団		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 5 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☒ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ° A01H 5/00, C12N 15/09, C12N 15/31

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ° A01H 5/00, C12N 15/09, C12N 15/31

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS, DDBJ, DDBJ new, GenBank new, EMBL new, GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Hideya Fujimoto et al., BIO/TECHNOLOGY, vol. 11, p. 1151-1155 (1993)	1, 5, 8, 13, 15-18, 21 2-4, 6, 7, 9-14, 19, 20
X Y	Frederick J. Perlak et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 88, p. 3324-3328 (1991)	1, 5, 8, 14-18, 21 2-4, 6, 7, 9-13 19, 20

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22. 06. 99

国際調査報告の発送日

06.07.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長井 啓子



2 B

9123

電話番号 03-3581-1101 内線 3236





C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Rina Iannaccone et al., Plant Mol. Biol., vol. 34, p. 485-496 (1997)	1, 5, 8, 15-18, 21 2-4, 6, 7, 9-14 19, 20
X Y	Pamaela J. Green, Plant Physiol., vol. 102, p. 1065-1070 (1993)	1, 5, 8, 15-18, 21 2-4, 6, 7, 9-14 19, 20
Y	Dancis A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 89, p. 3869-3873 (1992)	20
Y	Johnston M. et al., NATURE, vol. 387 (6632 Suppl), p. 87-90 (1997)	20 —
A	Brian Keith et al., The EMBO Journal, vol. 5, p. 2419-2425 (1986)	1-21



# Sequence, Structure, and Evolution of a Complete Human Olfactory Receptor Gene Cluster

Gustavo Glusman,\* Alona Sosinsky,\* Edna Ben-Asher,\* Nili Avidan,\* Dina Sonkin,\* Anita Bahar,\* André Rosenthal,† Sandra Clifton,‡ Bruce Roe,‡ Concepción Ferraz,§ Jacques Demaille,§ and Doron Lancet\*,<sup>1</sup>

\*Department of Molecular Genetics and The Crown Human Genome Center, The Weizmann Institute of Science, Rehovot 76100, Israel;

†Institut für Molekulare Biotechnologie, Postfach 100813, D-07708 Jena, Germany; ‡Department of Chemistry and Biochemistry, University of Oklahoma, Norman, Oklahoma 73019; and §Institut de Genetique Humaine, UPR 1142, CNRS,

141, rue de la Cardonille, 34396 Montpellier Cedex 5, France

Received July 23, 1999; accepted October 18, 1999

The olfactory receptor (OR) gene cluster on human chromosome 17p13.3 was subjected to mixed shotgun automated DNA sequencing. The resulting 412 kb of genomic sequence include 17 OR coding regions, 6 of which are pseudogenes. Six of the coding regions were discovered only upon genomic sequencing, while the others were previously reported as partial sequences. A comparison of DNA sequences in the vicinity of the OR coding regions revealed a common gene structure with an intronless coding region and at least one upstream noncoding exon. Potential gene control regions including specific pyrimidine:purine tracts and Olf-1 sites have been identified. One of the pseudogenes apparently has evolved into a CpG island. Four extensive CpG islands can be discerned within the cluster, not coupled to specific OR genes. The cluster is flanked at its telomeric end by an unidentified open reading frame (C17orf2) with no significant similarity to any known protein. A high proportion of the cluster sequence (about 60%) belongs to various families of interspersed repetitive elements, with a clear predominance of LINE repeats. The OR genes in the cluster belong to two families and seven subfamilies, which show a relatively high degree of intermixing along the cluster, in seemingly random orientations. This genomic organization may be best accounted for by a complex series of evolutionary events. © 2000 Academic Press

## INTRODUCTION

Environmental stimuli are recognized by sensory neurons, and this information is transmitted to the

Sequence data from this article have been deposited with the EMBL/GenBank Data Libraries under Accession Nos. AC007194, AF087915–AF087930, and AF155225.

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed. Telephone: 972-8-9343683. Fax: 972-8-9344112. E-mail: [bmlancet@weizmann.ac.il](mailto:bmlancet@weizmann.ac.il).

brain, where it is decoded to provide an internal representation of the external world. The vertebrate olfactory system is exquisitely adapted for recognition and discrimination among a large number of odorants, with high sensitivity and specificity (Laurent, 1997; Pilpel *et al.*, 1998). The initial step in olfactory discrimination involves the interaction of odorant molecules with a large repertoire of specific receptors.

Olfactory receptor (OR) genes encode G-protein-coupled seven-transmembrane proteins (Buck and Axel, 1991). Unlike the somatic gene recombination and mutation mechanisms that account for immunoglobulin diversity, the OR repertoire diversity seems to be germline-inherited. The OR gene superfamily is the largest in the mammalian genome. It is estimated to consist of several hundred genes in mammalian species and about 100 genes in catfish (reviewed in Mombaerts, 1999), suggesting a large expansion of the OR repertoire in higher vertebrates. A given OR was shown to be expressed by about 0.1% of the sensory neurons within the rodent olfactory epithelium (Vassar *et al.*, 1993; Ressler *et al.*, 1993). Estimating 500–1000 OR genes in the rat genome (Buck and Axel, 1991), these findings are consistent with the phenomenon of clonal and allelic exclusion in ORs (Lancet, 1991; Chess *et al.*, 1994; Malnic *et al.*, 1999), in which a neuron expressing a given receptor does not activate expression of other ORs. The multiplicity of receptors reflects the needs of a combinatorial coding system, in which each receptor may bind many odorants and each odorant binds several receptors (Lancet, 1986; Malnic *et al.*, 1999), as analyzed by a probabilistic model (Lancet *et al.*, 1993).

The OR repertoire contains a large percentage of pseudogenes that may be important for the generation and maintenance of diversity. The especially large number of OR pseudogenes in the human genome (up to ~70%) (Rouquier *et al.*, 1998) may reflect a loss





of functional genes in the "microsmatic" primates (Sharon *et al.*, 1999).

Many of the human OR genes appear in genomic clusters with 10 or more members (Ben-Arie *et al.*, 1994; Glusman *et al.*, 1996; Vanderhaeghen *et al.*, 1997; Carver *et al.*, 1998; Trask *et al.*, 1998). An estimated total number of 500 human OR genes would indicate 30–50 such clusters, about half of which have been identified by cloning or by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) on almost all human chromosomes (Rouquier *et al.*, 1998). In mouse, in which the estimated OR number may reach more than 1000, 12 clusters have so far been identified by genetic linkage on seven different chromosomes (Sullivan *et al.*, 1996). OR genomic clustering also was indicated by Southern hybridization analysis in dog (Issel Tarver and Rine, 1996) and by genomic mapping in zebrafish (Barth *et al.*, 1997). The complete collection of OR-containing genomic regions has been termed the "olfactory subgenome" (Ben-Arie *et al.*, 1993; Glusman *et al.*, 1996), estimated to encompass ~1% of the entire genome of mammalian species.

The availability of genomic sequences surrounding OR genes provides a unique opportunity to study the evolution of this multigene superfamily and to trace the mechanisms or genome dynamics that may have been responsible for its current size and variety. Using sequence comparison, ORs are classified into families (>40% amino acid identity) and subfamilies (>60% amino acid identity) (Ben-Arie *et al.*, 1994). An analysis of clusters in human (Ben-Arie *et al.*, 1994; Trask *et al.*, 1998), mouse (Sullivan *et al.*, 1996), and zebrafish (Barth *et al.*, 1997) indicates that each cluster may contain members of several subfamilies or even families. This suggests that present-day OR clusters have evolved in a complex path, involving ancient precursor gene duplications, as well as more recent within-cluster gene duplications. Conversely, genes of a given subfamily may be found in more than one cluster (Sullivan *et al.*, 1996; Rouquier *et al.*, 1998), suggesting that clusters may be duplicated, in part or in their entirety. In the latter case, this may occur via a duplication process that generates paralogous regions on different chromosomes. Repetitive genomic DNA elements (e.g., *Alu* and *LINE*) were suggested to have a crucial role in mediating recombination events that lead to OR gene duplications (Glusman *et al.*, 1996). Finally, the olfactory subgenome has been hypothesized to be "exclusive" in the sense that no non-OR genes have been found interspersed with OR genes (Glusman *et al.*, 1996).

The OR coding regions are uninterrupted by introns in the genome (Ben-Arie *et al.*, 1994) like many G-protein-coupled receptors (Gentles and Karlin, 1999), though the possibility of at least one exception has been reported (Walensky *et al.*, 1998). Characterization of human and murine OR genes revealed an intron separating a noncoding leader exon and from the coding exon (Glusman *et al.*, 1996; Asai *et al.*, 1996) and

showed that transcription is initiated from a region upstream from the leader exon (Asai *et al.*, 1996; Walensky *et al.*, 1998; Qasba and Reed, 1998). The mechanism of control that generates the complex pattern of odorant receptor expression still remains largely unknown.

Partial genomic sequences of OR gene clusters have been published (Glusman *et al.*, 1996; Brand-Arpon *et al.*, 1999), giving initial genomic insights into the organization of OR genes, their structure and evolution, as well as some hints on potential mechanisms for transcriptional control. We present here the sequencing and analysis of the first complete OR gene cluster. The full analysis and annotation of the sequence, as well as ancillary information, can be viewed at [http://bioinfo.weizmann.ac.il/papers/C17olf\\_cluster](http://bioinfo.weizmann.ac.il/papers/C17olf_cluster).

## MATERIALS AND METHODS

**Reagents and equipment.** Cosmids were from library ICRFcl05 isolated from human cell line LCL127 (Nizetic *et al.*, 1991) from the Resource Center, Primary Database of the German Human Genome Project (Nizetic *et al.*, unpublished results). Ten clones of the 80 cosmids covering the cluster were chosen for sequencing as follows: F03103 (cos17), D10132 (cos26), H07155 (cos32), B01193 (cos39), F06137 (cos46), E06173 (cosL53), E06184 (cos58), F1155 (cos65), H0468 (cos68), and D093 (cos73). In addition, two PAC clones C10910Q3 (P8) and E02527Q3 (P123) from the whole-genome library LLNLP704 (Ioannou *et al.*, 1994) were sequenced. Additional cosmids mapped (written in pairs of ICRFcl05 number–our number) were H1241–4; D0345–6; E0364–7; C0435–9; A08110–19; G06112–20; F04113–21; G11124–22; A02138–27; B09144–29; H09113–42; F08120–44; D01121–45; A06163–51; G10182–56; F09183–57; B0595–61; D0759–62; B1015–63; F082–66; E101–69; C127–70; C117–71; D0569–74; A107–75, and H0689–76. Additional PACs mapped (written in pairs of LLNLP704 number–our number) were N01235Q19–1; E13239Q19–2; M121198Q4–3; B211178Q4–4; M15660Q3–5; I17730Q3–6; J10811Q3–7; C10910Q3–8; E10912Q3–9; F05891Q3–10; M15947Q3–11; N04302Q19–101; N21613Q3–102; M21613Q3–103; K22613Q3–104; E24597Q3–106; P18817Q3–108; B02928Q3–109; P041058Q3–110; P041064Q3–111; L091077Q3–112; A091041Q3–113; P021089Q4–119; E02527Q3–123; P16680Q3–128; M22845Q3–129; P241019Q3–131; and P231019Q3–132.

**Mapping of PACs.** The PAC clones used in the current work were obtained from RZPD using DNA probes prepared from the cosmids at the ends of the three cosmid contigs described (Ben-Arie *et al.*, 1994), i.e., cosmids 26, 53, 58, and 68. All the PAC clones thus obtained were subjected to PCR analysis with primers specific for several OR coding regions (ORs 93, 201, 2, 7, 30, 23, 24, 208, 209, 210, 4, and 31), as well as with some cosmid ends (Fig. 1).

**Generation of sequencing templates.** Except for cosmid 65, all the clones were sequenced using the shotgun strategy (Bodenteich *et al.*, 1993; Rowen and Koop, 1994). Cosmid or PAC DNA was sheared either by sonication or by nebulization, and the ends were repaired by treatment with T4 DNA polymerase followed by Klenow treatment or alternatively by treatment with mung bean nuclease followed by T4 DNA polymerase. The repaired DNA was size-fractionated on a 0.8% agarose gel, and fragments of 0.8–1.5 kb were excised and purified with a Qiagen gel extraction kit (Qiagen GmbH, Germany) for ligation with M13 RF phage DNA (Novagen). Alternatively, fragments of 2–6 kb were excised and purified from low-melting-point 0.8% agarose gels with gelase (Epicentre) or a Qiagen kit as above, for ligation to pBluescript (Stratagene) or pUC18 (Pharmacia) vectors. Ligation was performed with a Rapid Ligase kit (Boehringer) or with a Fast Link kit (Epicentre) according to the



manufacturer's instructions. The ligated DNA was used for transformation of XL1 Blue competent cells (Stratagene). DNA from single clones was subjected to direct sequencing, or PCR products of these clones were subjected to sequencing reactions. When direct sequencing was applied, DNA was prepared by Qiagen kits; either an M13 extraction kit for single-stranded DNA or the turbo miniprep kit for double-stranded DNA was used according to the manufacturer's instructions (Qiagen GmbH, Germany). These kits were used in their 96-well format with the 96-manifold apparatus, which was connected to a Biomek 2000 robot (Beckman). Some clones were also prepared by a cleared lysate filter-based protocol (Chisoe *et al.*, 1995) and sequenced as described (Bodenteich *et al.*, 1993). When PCR products were to be sequenced, they were cleaned by a 96-well Gel Filtration Block (Edge BioSystems) prior to fluorescence labeling.

**Sequencing reactions.** DNA was labeled either by fluorescence-labeled primers or by fluorescent dye terminators—Prism cycle sequencing and Big-Dyes kits (Perkin-Elmer/Applied Biosystems)—and analyzed on ABI 373 or ABI 377 sequencers.

**Finishing and gap closure.** Finishing of cosmid 65 as well as finishing of cosmids 17, 68, and PAC 8 was performed using the differential extension with nucleotide subsets (DENS) method (Raja *et al.*, 1997). Briefly, in this method single-stranded DNA is synthesized by PCR and is then subjected to DNA sequencing by primer walking using a presynthesized primer library. Cosmid 65 was used as template to sequence the 10-kb gap between cosmids 46 and 58. Primers for synthesis of the desired segment on cosmid 65 were designed using the programs Oligo (Rychlik, 1995) and Amplify (Engels, 1993) based on known sequence from the overlapping cosmids 46 and 58. Sequence finishing of the other clones was performed by standard primer walking along the regions where sequence was in doubt.

**Sequence assembly.** Assembly was performed using Sequencher 3.1 software from GeneCodes Corp. and/or phrap (University of Washington). Based on experience with the sequencing methodology in other projects, we estimate the precision of the consensus sequence to be over 99.9%. Additional quality control was obtained by comparison of overlapping, independently sequenced clones. The cluster sequence has been deposited with GenBank under Accession No. AC007194. The full coding sequences for the 17 OR genes in the cluster have been deposited with GenBank under Accession Nos. AF087915–AF087930 and AF155225.

**Sequence analysis.** Sequences were analyzed using the GESTALT Workbench (Glusman and Lancet, in preparation). Briefly, GESTALT is a Perl-based workbench for automated large-scale genomic sequence analysis, comparison, and annotation. GESTALT integrates and depicts graphically the output of diverse sequence analysis algorithms, including database searches, gene modeling tools, recognition of interspersed repeats, statistical ORF analysis, and compositional analyses, as well as user annotation.

**Open reading frame analysis.** The significance of each observed open reading frame (ORF) of length  $L$  was estimated by calculating an expectation value  $E(L)$  as the probability of finding an ORF of length  $L$  or longer, times the number of possible such ORFs (approximately the length of the sequence). The probability for length  $\geq L$  was calculated assuming an exponential distribution with the extension parameter being the frequency of stop codons in the sequence, using either the observed stop frequency in the entire sequence or the expected value for the local G+C content.

**Identification of coding regions.** Statistically significant open reading frames were studied by database searches, unless recognized to belong to repetitive elements by RepeatMasker (Smit and Green, 1997). The entire genomic sequence obtained was analyzed using FASTY (Pearson *et al.*, 1997) against a database of translated OR sequences (Glusman *et al.*, in preparation) as well as by dot-plot to representative OR nucleotide sequences. GenScan (Burge and Karlin, 1997) and fgenes 1.6 (Solovyev and Salamov, 1997) were used to build comprehensive gene models within the cluster sequence. For each OR coding region identified in the cluster, the prediction success

was calculated as the fraction of its nucleotides predicted to be within a coding exon, in the proper strand.

**Identification of CpG islands.** The local concentration of CpG dinucleotides was calculated as the contrast value (CV) or ratio between observed and expected frequency, as  $CV = [CpG]/[C][G]$ , where  $[C]$  indicates frequency of C nucleotides, etc. CpG dinucleotides are underrepresented in the human genome (Karlin *et al.*, 1998). CpG islands are defined as regions over 200 bp with CpG CV > 0.6 and G+C content above 50%.

**Phylogenetic analysis.** The conceptually translated OR sequences from this cluster were compared to additional human OR sequences, chosen to represent Class II families 1–7 from several chromosomal locations. Fish and human Class I representatives are added for comparison. The human  $\beta$ -3 adrenergic receptor (HSB3A) was used as outgroup. Multiple alignment and neighbor-joining analysis were performed using ClustalX (Higgins *et al.*, 1996) with default parameters. Confidence was estimated using 1000 rounds of bootstrapping. Phylogenetic trees were drawn using TreeView (Page, 1996).

**Divergence time estimation.** This was performed (Glusman *et al.*, 1996) by comparing nucleotide sequences on which no selection is assumed to take place. The estimated substitution level (ESL) was calculated using the one-parameter model (Jukes and Cantor, 1969) and then translated to million years ago (Mya) as described for the  $\psi$ -globin gene locus (Bailey *et al.*, 1991) with substitution rates (expressed as  $10^{-9}$  substitutions/site/year) of: 1.1 for the last 19.2 Mya (gibbon/human divergence), 1.7 for the period 25.0–19.2 Mya (cercopithecoid/hominoid divergence), 1.9 for the period 34.2–25.0 Mya (platyrrhine/catarrhine divergence), 3.5 for the period 55.0–34.2 Mya (strepsirhini/haplorhini divergence), and 5.0 before 55 Mya (mammalian-wide). These figures reflect the "hominoid slowdown" in nucleotide sequence mutation frequencies (Bailey *et al.*, 1991) and do not reflect  $\psi$ -globin-specific evolution rates.

**Gene structure prediction.** To predict potential upstream noncoding exons, the genomic environment of each OR coding region in the cluster (except for the 5' truncated OR17-25) was extensively analyzed to generate a gene model. The genomic region of each OR gene was defined to include up to 15 kb upstream from the start codon and 5 kb downstream from the termination codon. The relevant genomic sequence employed was trimmed for seven OR genes, to avoid overlaps: for OR17-228, 12.5 kb were used (downstream from OR17-40); OR17-24 and OR17-40 have a common upstream region in opposite orientations, and therefore half (8.9 kb) was taken for each. Similarly, 11.1 kb were used for OR17-201 and OR17-2. From our analysis, the 5' genomic region of OR17-4 includes at least 12.8 kb; the genomic region of OR17-210 was correspondingly trimmed to 10.4 kb. Several exon prediction programs based on different algorithms were used, including GenScan (Burge and Karlin, 1997) (suboptimal exon cut-off used: 0.1), GAIL II (Xu *et al.*, 1994), Genie (Kulp *et al.*, 1996), and the programs fgenes, fgenes, hexon, and fex from the GeneFinder package (Solovyev *et al.*, 1995; Solovyev and Salamov, 1997). Potential exons recognized by at least three programs were analyzed further. Dot-plot analysis was used to determine the extents of the duplicated regions within subfamilies, and only exons within such regions were considered as conserved and therefore potentially functional. Dot-plot analysis and sequence alignments were analyzed by GeneAssist 1.1 from ABI, Perkin-Elmer.

**Prediction of additional gene structure elements.** The acceptor splicing sites for the predicted coding exons were detected by the programs SPL from the GeneFinder package (Solovyev and Salamov, 1997) and SSPNN (Brunak *et al.*, 1991). Donor splicing sites for the potential upstream exons were detected by the SPL program with an LDF value of 0.85 used as cut-off between strong and weak sites. Polyadenylation signals were detected using POLYAH (Solovyev and Salamov, 1997). Potential promoters and corresponding transcription start sites (TSS) were identified using TSSC and TSSW (Solovyev and Salamov, 1997) with minimal score 0.4 and by PPNN (Reese *et al.*, 1996) with minimal score 0.8.





**Control region analysis.** To detect any significant similarities among potential control regions, the oligonucleotide analysis tool (van Helden *et al.*, 1998) from the Yeast Regulatory Tools (van Helden *et al.*, in preparation) was used. We implemented also a variant that relaxes the requirements on the patterns found, allowing the detection of similar patterns in addition to identical patterns. The sequences were also analyzed using the segment pair overlap method implemented in MACAW (Schuler *et al.*, 1991), as well as the Gibbs sampler as implemented with the Yeast Regulatory Tools. The location of binding sites for members of the two families of transcription factors NF-1 and O/E were examined by MatInspector V2.2 (Quandt *et al.*, 1995) using the TransFac database. Olf-1 and NF-1 sites were also mapped by the Word Mapper tool of the GESTALT Workbench (Glusman and Lancet, in preparation) using the consensus sequences TCCCNRRGR and GCTGCCANNNTGCCAG, respectively (R represents purines). Potential recombinatorial signal sequences (Sakano *et al.*, 1981) were mapped using the consensus CACTGTG (N)<sub>x</sub>CGTTTTTGT (where  $x$  is 12 or 23).

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Complete Sequence of an Olfactory Receptor Gene Cluster*

**Mapping and sequencing.** We have obtained 412 kb of contiguous genomic sequence encompassing the OR gene cluster on human chromosome 17. The sequence is a composite of 12 cosmid and 2 PAC clones (Fig. 1). Additional PAC clones (P110 and P111, see Fig. 1) that overlap with cos58 and extend the cluster map at its telomeric end have been identified, but PCR analysis with OR-specific OR5B/OR3B degenerate primers (Ben-Arie *et al.*, 1994) suggested that they were devoid of additional OR coding regions. The final size of the cluster sequence fits the ~400 kb estimated in the initial characterization of this cluster (Ben-Arie *et al.*, 1994). STS marker 506 (D17S126) is present within this cluster (in cos73) as originally mapped by PCR (Ben-Arie *et al.*, 1994). In addition, STS marker D17S1548 (WI-5436) is present at the end of this cluster (in cos58). D17S1548 is mapped to 48.8 cR from the 17p telomere or 4.521 Mb according to the UDB map of chromosome 17 (Chalifa-Caspi *et al.*, 1997); see <http://bioinformatics.weizmann.ac.il/udb>.

Three cosmid contigs have been described (Ben-Arie *et al.*, 1994), and their orientation and distances have been estimated by free-chromatin FISH. Analysis of several PAC clones covering this region enabled us to correct the physical map of the cluster, as shown in Fig. 1. The original improper mapping of several cosmids was found to derive from the existence of a large genomic duplication, described below.

**An unclonable region.** A 2.6-kb fragment in cosmids 17 and 68 (open boxes, Fig. 1) was particularly refractory to M13 subcloning and significantly under-represented in sequenced shotgun subclones. Closure was accomplished by DENS primer walking (Raja *et al.*, 1997). Interestingly, this segment posed no shotgun cloning problems upon direct sequencing from a partially deleted cosmid clone (R28, Fig. 1). Analysis of the resulting sequence shows that the fragment is located between very old MIR (SINE) and Charlie (DNA/

MER1 type) repeats, which are ~20% divergent from their respective consensus sequences. No internal repeats or palindromes were detected in this apparently unclonable segment, but it was found to be singularly G+C-poor (30% overall, down to 25% in the middle), culminating with an A+T low-complexity region.

### *The Detected OR Genes*

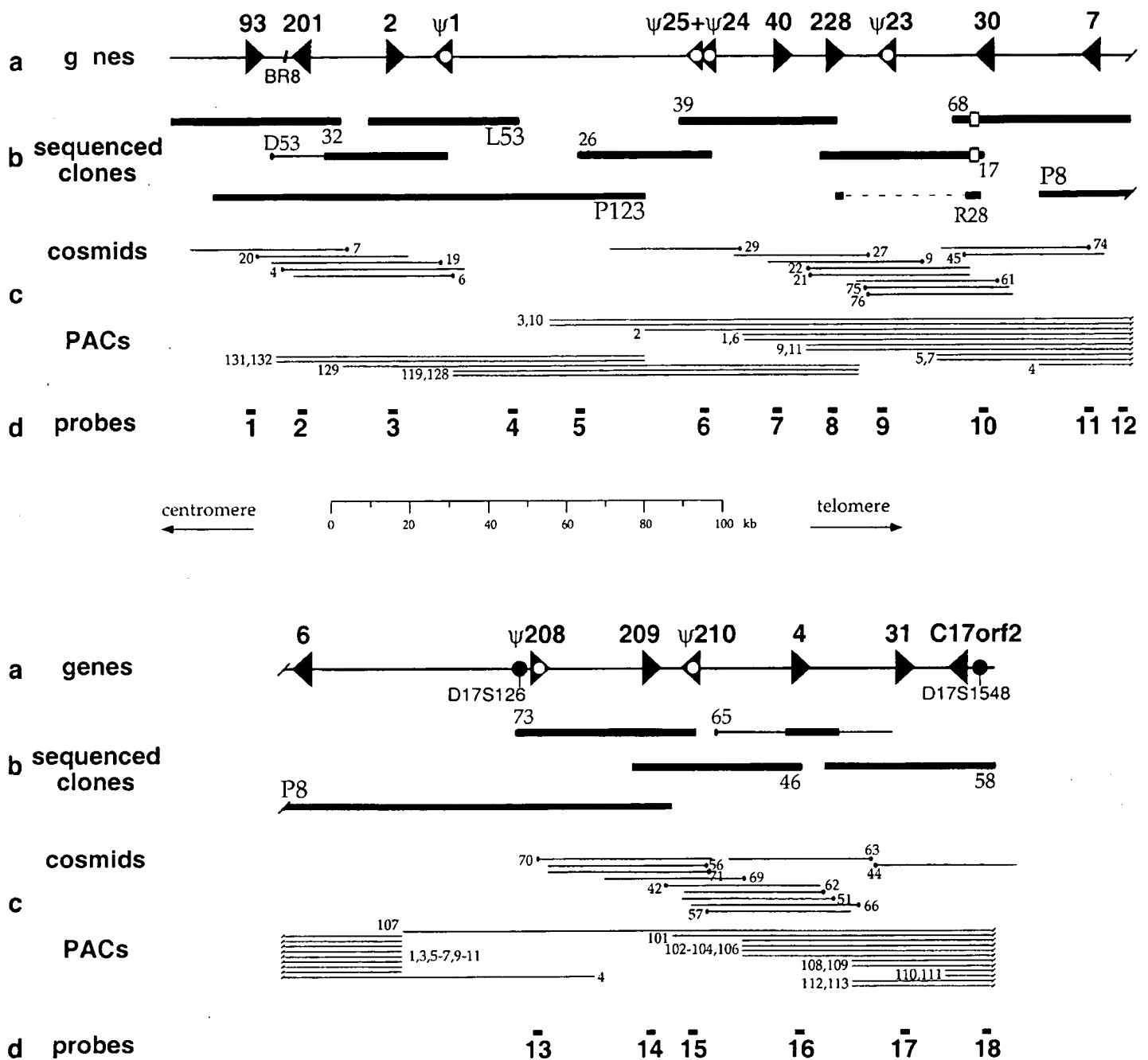
The genomic sequence in the OR cluster was compared with a database of OR gene sequences at both the nucleotide and the translated amino acid levels. In total, 17 OR coding regions were recognized (Table 1), confirming the presence of 11 of the OR genes described in the initial report on this cluster (Ben-Arie *et al.*, 1994), as well as 6 formerly undetected coding regions. Approved nomenclature symbols (Glusman *et al.*, in preparation) are listed in Table 1. From sequence analysis only, 6 of the 17 OR coding regions are pseudogenes, while the remaining 11 are apparently functional. The expression of OR17-93 and OR17-40 has been previously shown experimentally (Ben-Arie *et al.*, 1994; Crowe *et al.*, 1996). We have experimental evidence that all the remaining apparently functional genes are transcribed (Sosinsky *et al.*, in preparation) except for OR17-6, which may turn out to be a pseudogene.

We have previously reported (Glusman *et al.*, 1996) the sequence analysis of a cosmid (cos39) covering the middle of the cluster, which encodes two genes (OR17-40 and OR17-228) and two fused, truncated pseudogenes (OR17-24 and OR17-25, Fig. 2a). The genomic sequence of cosmids D53 and L53 confirmed the existence of OR17-32, an allelic variant of OR17-2 that differs from it by only 2 bp of 648 bp (Sharon *et al.*, in preparation), indicating that the individual from whom the cosmid library was created was heterozygous at this locus. Similarly, the presence of the OR17-23 pseudogene was confirmed, but its OR17-90 variant was not detected in the sequenced cosmids nor in population studies (Sharon *et al.*, in preparation). In contrast, OR17-30 occurs as two almost identical but disjointed copies in the cluster: the newly detected OR gene (hereafter referred to as OR17-31) appears to be the OR gene closest to the telomeric end of the cluster.

Two additional OR pseudogenes (OR17-208 and OR17-1) and two additional, apparently functional OR genes (OR17-6 and OR17-7) were detected. OR17-208 has an in-frame stop codon (Fig. 2a) but otherwise is apparently intact, suggesting that this is a relatively recent mutation in a gene from family 1. Indeed, its chimpanzee orthologue lacks this stop codon (Sharon *et al.*, 1999). OR17-1 harbors several alterations that render it a pseudogene, including four frameshifting mutations (Fig. 2a). These four novel OR regions represent three new subfamilies within family 1 (Fig. 3).

Of the 17 OR coding regions in this cluster, 6 (3 pseudogenes and 3 apparently functional genes) were detected only by genomic sequencing. The 11 previ-





**FIG. 1.** Physical map of the olfactory receptor gene cluster on human chromosome 17p13.3. (a) Location and orientation from 5' to 3' of the OR coding regions (arrowheads) and the D17S126 and D17S1548 markers. BR8 represents the approximate DNA breakpoint of Miller-Dieker syndrome patient BR8 (Ben-Arie *et al.*, 1994). Pseudogenes are indicated by  $\psi$  and white circles. (b) The sequenced cosmid and PAC clones as detailed under Materials and Methods. Thin lines indicate regions not sequenced. The dashed line in cosmid R28 indicates the region deleted in this clone. Open boxes in cosmid 17 and 68 indicate the unclonable region. (c) The approximate extents of all additional cosmid and PAC clones mapped. (d) The PCR probes used for mapping PACs.

ously detected OR genes in this cluster have between zero and three mismatches in each degenerate PCR primer site or up to four mismatches in total (Fig. 2b). Three of the previously undetected OR coding regions (OR17-1, OR17-25, and OR17-208) have a larger number of mismatches. OR17-31 is almost identical to OR17-30 in the coding region (7 differences of 939 bp, or 99.3% identical). These results underscore the importance of genomic sequencing for reaching a definitive characterization of gene clusters, even when the gene families are well studied.

A recent independent genome-wide sequence survey (Rouquier *et al.*, 1998) of human ORs produced six partial ORs from chromosome 17 that map to this same chromosomal location, although having slight sequence variations. Therefore it is unlikely that additional family 1 and 3 OR genes occur in chromosome 17. However, members of more divergent OR families are present at other loci on chromosome 17, e.g., HTPCR16 in 17q21-q22 (Vanderhaeghen *et al.*, 1997). Indeed, we found this genomic region (GenBank Accession No. AC005962) to include two OR genes belonging



TABLE 1

## Characteristics of the OR Coding Regions in the Olfactory Receptor Gene Cluster on Human 17p13.3

Name	HUGO	Start	End	Str	Length	%G+C	CpG	%CpG	$\psi$	%GS	%FG
OR17-93	<i>OR1E2</i>	20,283	21,254	+	972	49.9%	10	1.0%		100	66
OR17-201	<i>OR3A3</i>	33,539	32,592	—	948	55.0%	15	1.6%		100	100
OR17-2	<i>OR1E1</i>	55,749	56,693	+	945	50.0%	10	1.1%		100	100
OR17-1	<i>OR1R1P</i>	68,245	67,250	—	996	65.4%	93	9.3%	Yes	58	(64)
OR17-25	<i>OR3A5P</i>	142,943	142,203	—	741	54.3%	9	1.2%	Yes	60	0
OR17-24	<i>OR3A4P</i>	143,826	142,944	—	883	54.5%	13	1.5%	Yes	100	0
OR17-40	<i>OR3A1</i>	161,571	162,518	+	948	54.1%	18	1.9%		100	47
OR17-228	<i>OR3A2</i>	175,237	176,184	+	948	53.9%	18	1.9%		95	100
OR17-23	<i>OR1D3P</i>	188,541	187,602	—	940	53.3%	13	1.4%	Yes	85	0
OR17-30	<i>OR1D4</i>	213,474	212,536	—	939	52.3%	10	1.1%		100	55
OR17-7	<i>OR1A1</i>	238,482	237,553	—	930	47.3%	15	1.6%		100	0
OR17-6	<i>OR1A2</i>	256,581	255,652	—	930	45.3%	10	1.1%		100	0
OR17-208	<i>OR1P1P</i>	298,430	299,422	+	993	53.3%	20	2.0%	Yes	(55)	0
OR17-209	<i>OR1G1</i>	325,764	326,705	+	942	48.9%	12	1.3%		89	0
OR17-210	<i>OR1E3P</i>	336,884	335,937	—	948	50.3%	11	1.2%	Yes	(81)	0
OR17-4	<i>OR1D2</i>	360,316	361,254	+	939	50.5%	8	0.9%		100	68
OR17-31	<i>OR1D5</i>	389,717	390,655	+	939	52.9%	11	1.2%		100	0
Total	17			8/9	3.9%	51.6%	12.7	1.36%	6	99/51	49/11

*Note.* Trivial name and HUGO nomenclature name; absolute location from the centromeric end of the cluster and strand (Str); length, G+C content, number of CpG dinucleotides and their fraction of the coding region; pseudogene status as predicted from the sequence ( $\psi$ ); percentage coverage of OR coding regions by predicted exons of GenScan and fgenes (GS and FG, respectively). Figures in parentheses indicate opposite strand predictions (GenScan) or the part in the proper frame (fgenes). Summary line: number of genes in the cluster and their distribution by orientations; fraction of coding sequence in the cluster; average G+C content, average number and percentage of CpG dinucleotides (excluding OR17-1); pseudogene count; average true-positive percentage rate of GenScan and fgenes for genes/pseudogenes.

to family 4: HTPCR16 and a new member of its subfamily (approved symbols (Glusman *et al.*, in preparation) *OR4D1* and *OR4D2*, respectively; see Fig. 3).

#### Analytical Gene Prediction

The sequence of the OR cluster was subjected to gene prediction analysis using the GenScan and fgenes programs (Fig. 4), which predicted 33 and 15 genes, respectively. Table 1 summarizes the success rate for each OR coding region (true positives). Overall GenScan yielded better predictions than fgenes, recognizing 99% of the coding sequence for apparently functional genes and 51% of that in pseudogenes, versus 49 and 11% for fgenes, respectively. In two cases antisense-overlapping ORFs (Merino *et al.*, 1994) of pseudogenes were recognized by GenScan: the OR17-208 pseudogene, which is interrupted by an in-frame stop codon, and the OR17-210 pseudogene, which has two frameshifting mutations. The fgenes prediction for the OR17-1 pseudogene (which has several frameshifts; see Fig. 2) partially relies on the wrong frame. Gene modeling programs that do not use sequence comparison generally are unsuitable for modeling pseudogenes, yet a high proportion of OR genes are pseudogenic (Rouquier *et al.*, 1998; Sharon *et al.*, 1999). These programs are trained to identify multi-coding-exon genes, but no introns that interrupt OR coding regions have yet been reported, with one single potential exception (Walensky *et al.*, 1998). Since OR regions can be recognized easily by protein sequence similarity, we conclude that the method of choice for detecting OR genes in new genomic sequence is to compare it to

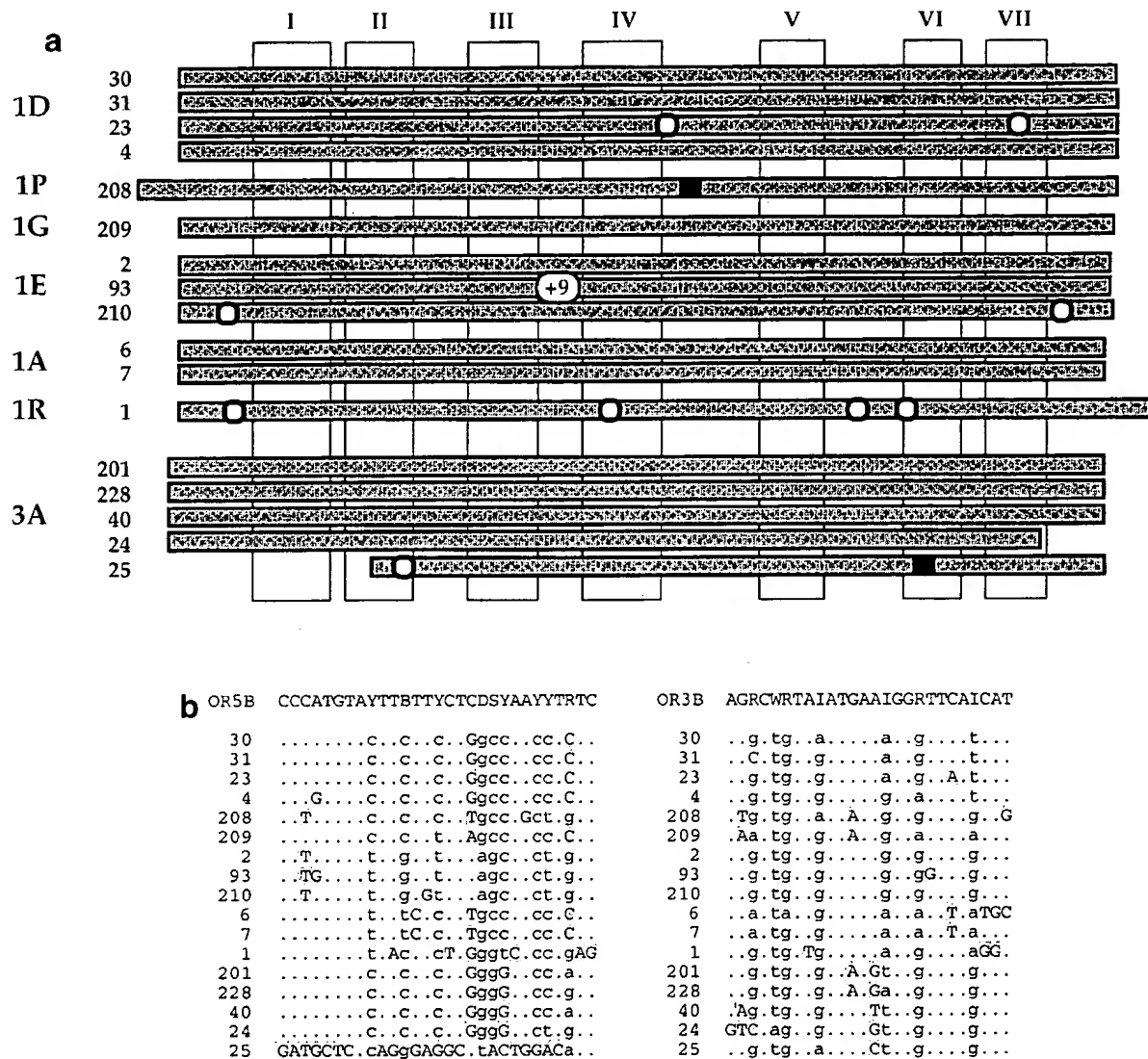
a database of OR sequences using any alignment tool able to incorporate frameshifts, such as FASTX or FASTY (Pearson *et al.*, 1997).

All of the statistically significant ORFs and most of the exons predicted represent OR coding regions (or their complementary strands), high-scoring segments within repetitive sequences (typically fragments of the *pol*-like polypeptide within L1 repeats), or very low-scoring, short exons, none of which finds homologues by blast (not shown).

#### A Non-OR Candidate Gene

A 297-codon-long ORF (nomenclature symbol C17orf2) was recognized by GenScan as a single-exon gene with a total score of 13.38. A polyadenylation signal is present 134 bp downstream from the stop codon. *C17orf2*, located at the telomeric end of the OR cluster, has a relatively high G+C content (63.2%) and is richer in CpG dinucleotides than expected from its nucleotide composition, especially at its 5' end. Even though the derived amino acid sequence was analyzed by exhaustive database searching, no homologues were detected. Borderline similarities to EST hits were not improved by clustering, and no particular fold could be assigned to the predicted amino acid sequence (not shown). The possibility exists that this long ORF has no coding content and that its length derives from the expected lower number of stop codons in a G+C-rich region; the composition-corrected expectation value for such an ORF is borderline (0.8). Alternatively, *C17orf2* could represent the first member of a new gene family, in line with the estimate that approx-





**FIG. 2.** The olfactory receptor coding regions. (a) The extent of each predicted peptide sequence is indicated on top of the locations of the seven-transmembrane domains (I to VII). Open circles denote frameshifts; black boxes indicate in-frame internal stop codons. The circled +9 indicates the location of a 9-amino-acid duplication in OR17-93 (Ben-Arie *et al.*, 1994). Gene names and subfamily classifications are indicated on the left. (b) The sequences recognized by the OR5B and OR3B degenerate primers: for each gene, periods indicate agreement with the primer consensus, lowercase letters indicate the nucleotide found at a primer degenerate position, and shaded uppercase letters indicate mismatches from the primer consensus.

imately 50% of all newly detected genes may represent novel families (Uberbacher *et al.*, 1996).

#### An OR Pseudogene Turned into a CpG Island

We have discovered a striking example of an OR gene whose entire coding region has evolved into an apparent CpG island. The OR17-1 pseudogene has the highest G+C content of all those in the cluster (65.43%, see Table 1) and includes 93 CpG dinucleotides (9.3% of length) while the other OR regions in the cluster have 8–20 CpGs (1 to 2% of length, Table 1). While this pseudogene has high G+C content and many CpG dinucleotides, it lacks Sp1 sites, which prevent remethylation of CpG islands (Brandeis *et al.*, 1994).

While this OR unit lost its protein coding function, it is apparently under new evolutionary constraints. Ancient, Class I (fish-like) OR pseudogenes have been reported to have adopted noncoding functions (i.e., reg-

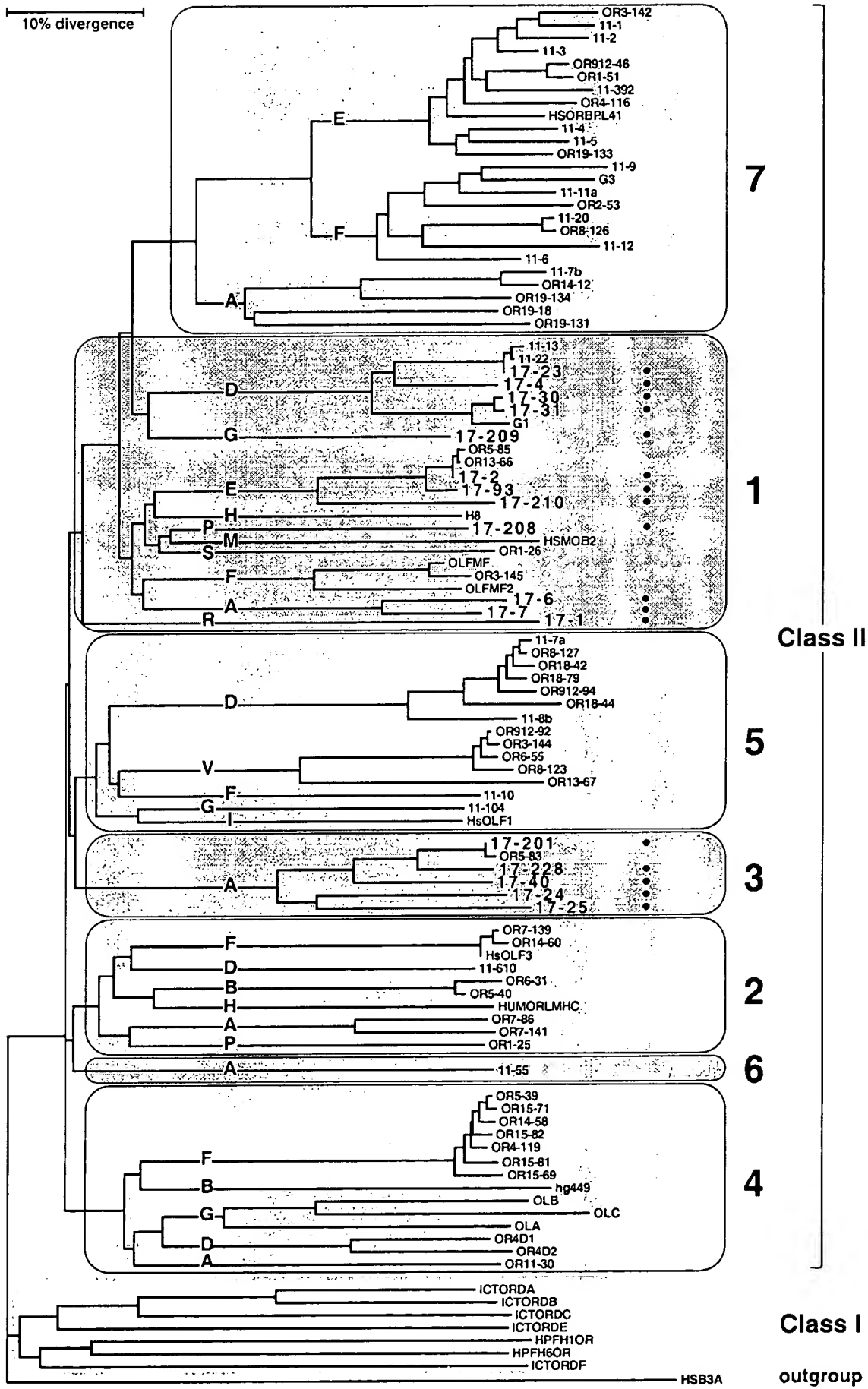
ulatory) as enhancers (Buettner *et al.*, 1998). In addition, the human matrix-attachment region (MAR) reported in GenBank locus HSM0B2 (Nikolaev *et al.*, 1996) is significantly similar to OR genes, apparently being an additional OR pseudogene, this time taking a structural role (Gimelbrant and McClintock, 1997). This MAR is mapped to 19p13.2 and is classified as a Class II, family 1 OR. We therefore hypothesize that OR genes, which are present in the genome in many copies, can also adopt new functions, much as observed for the pseudogenes of retrotransposons (von Sternberg *et al.*, 1992; Britten, 1994; Hanke *et al.*, 1995).

#### OR Clusters Contain CpG Islands

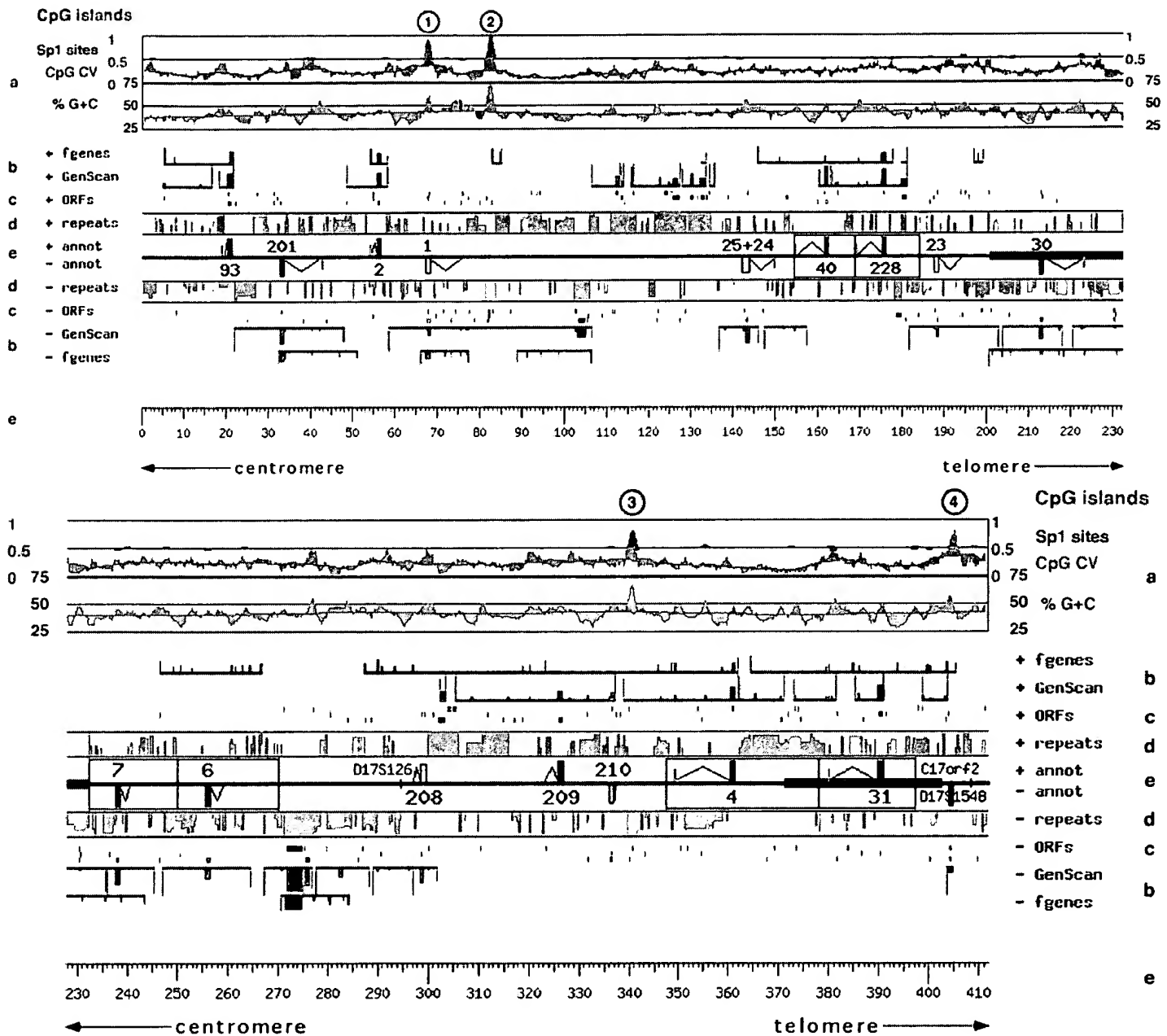
Compositional analysis of the complete sequence shows that this cluster belongs in the G+C-poor L isochore (Bernardi, 1993). Four CpG-rich segments (circled 1–4 in Fig. 4) were identified in the cluster.











**FIG. 4.** A sequence map of the cluster generated by the GESTALT Workbench. (a) Compositional analyses. CpG contrast values and %G+C are displayed as deviations from the regional average; CpG islands are denoted by circled numbers on top; Sp1 clusters are overlaid in blue; green %G+C stretches belong in the L isochore, and blue stretches belong in the H isochore. (b) Gene prediction results (fgenes and GenScan). Predicted exons are displayed in blue, with box height indicating exon quality (the scaling is arbitrary but consistent for each prediction program); complete gene structures are underlined in blue; predicted promoters and poly(A) signals are indicated in green and red, respectively. (c) Location of ORFs colored by statistical significance: brown and blue ORFs indicate  $E()$  value under 1 and  $1E-3$  for the cluster sequence, black ORFs indicate  $E()$  value under 1 for the whole genome ( $3.3E9$  bases). (d) Repetitive sequences. *Alus* are denoted in red, MIRs in purple, LINEs in green, other interspersed repeats in brown; box height indicates element youth as percentage identity with the subfamily consensus, from 50% (oldest) to 100% (youngest). (e) User annotation. Location, orientation, and intron-exon structure of the OR genes and C17orf2; putative control regions are indicated in green; pseudogenes are indicated by open boxes; also shown are locations of the STS markers. The thicker horizontal bars surrounding OR17-30 and OR17-31 indicate the extent of the duplicated region; the tandem OR17-40/OR17-228, OR17-6/OR17-7, and OR17-4/OR17-31 duplications are enclosed in rectangles. (e) Kilobase scale from the centromeric end of the cluster. (b) to (e) Features on top of the middle line run from 5' to 3', and features under the middle line are in the reverse orientation.

**FIG. 3.** Phylogenetic tree of representative human OR genes of Class II, families 1–7 (shaded). Capital letters on branches denote subfamilies. The OR genes from human chromosome 17 cluster are shown in larger font size and are marked with black dots. The human  $\beta$ -3 adrenergic receptor (HSB3A) is used as an outgroup, and several catfish (*Ictalurus punctatus*) ORs are included as Class I representatives. The bar indicates 10% amino acid divergence along each branch.



The most centromeric CpG island (circled 1) includes the complete coding region of the OR17-1 pseudogene. The most telomeric CpG island (circled 4) includes the long ORF *C17orf2*. The two remaining CpG islands (circles 2 and 3) are derived from recently inserted (<7 million years ago) SVA retroviral elements (Shen *et al.*, 1994). CpG islands 2 and 3 have many Sp1 sites (Brandeis *et al.*, 1994), as indicated by blue peaks over the CpG islands in Fig. 4. CpG island 4 has four Sp1 sites within it, and OR17-1 has none.

Our results indicate that the OR genes in this cluster do not have "private" CpG islands at their 5' ends: rather, a few CpG islands are present at an average frequency of one island per ~100 kb. These may be regulatory sequences potentially affecting the expression of the entire OR cluster or only part of it. We have similarly observed one CpG island in the 106-kb partial sequence of the human chromosome 3 OR gene cluster (Brand-Arpon *et al.*, 1999), in the range 22–23 kb of GenBank entry AF042089. As in the cluster described here, that kilobase-long CpG island is not associated with any particular OR gene.

#### High Abundance of Repetitive Sequences

Up to 60% of the cluster sequence is composed of repetitive elements of all known types, including LINEs (40%), SINEs (9%), LTR elements (6%), and DNA transposons (3%). Several instances of repetitive elements retroposing into previous repeats were observed, with up to five levels of repeated insertion into the same locus, a structure we have named the "genomic matrioshka" (Glusman *et al.*, 1998).

Thus, the cluster appears to have been highly permissive to repeated invasion by retroposing elements, especially those of the L1 type, which amount to 38% of the cluster sequence. Indeed, it is apparent that the cluster has been evolutionarily "breaking up" into subclusters separated by long L1-rich stretches (e.g., 75–135 and 270–335 kb, Fig. 4), sometimes engulfing pseudogenes (e.g., OR17-208). *Alu* repeats (amounting to 8% of the sequence) are somewhat clustered in the regions surrounding the OR genes. The high proportion of L1 repeats is consistent with this cluster being part of a low-GC content L isochore (Bernardi, 1993) within a G band (Gardiner, 1995).

#### Gene Duplications

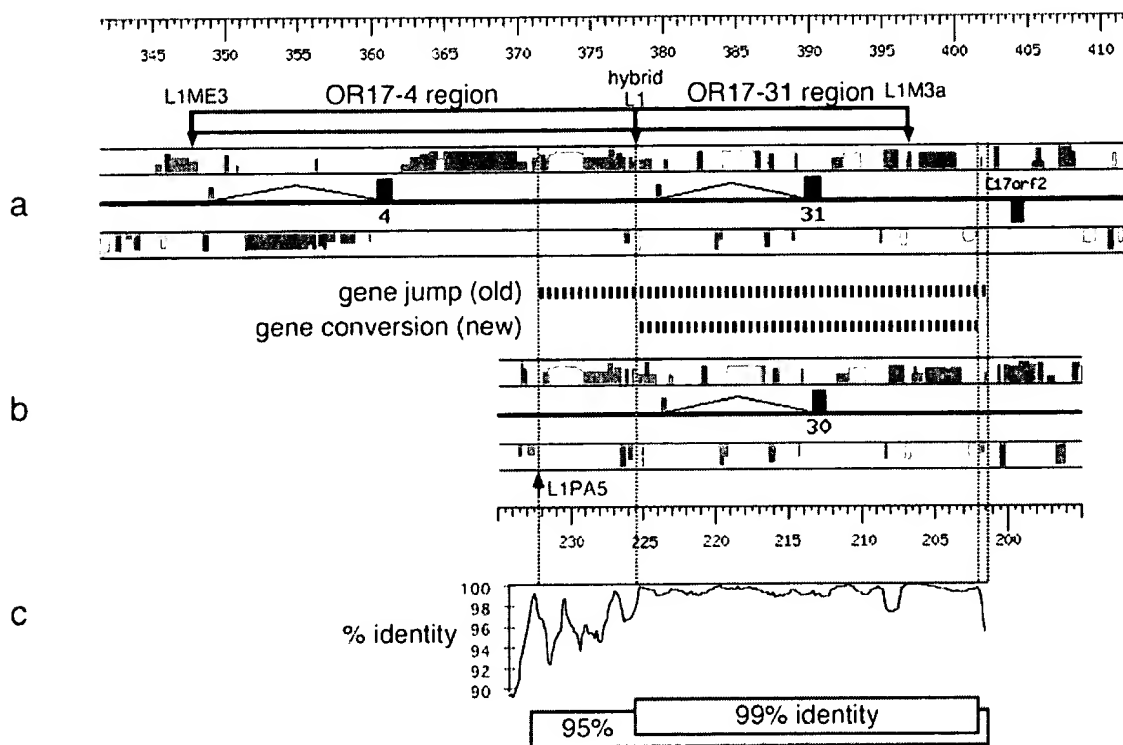
In previous work (Glusman *et al.*, 1996), we described the analysis of the tandem duplication of an 11-kb-long fragment, mediated by recombination between mammalian-wide interspersed repeats (MIRs) and estimated to have taken place 90–100 million years ago. This recombinatorial event duplicated an entire gene structure, producing two apparently functional copies, which today represent genes from the same subfamily (3A). Analysis of the complete cluster sequence reveals additional instances of large duplications that include entire genes.

*A tandem duplication of subfamily 1D genes.* The telomeric end of the cluster includes an additional example of an ancient tandem duplication, also apparently mediated by mammalian-wide repeats (of the L1 family). Figure 5a shows a schematic diagram of the genomic region surrounding genes OR17-4 and OR17-31 from subfamily 1D. As in the subfamily 3A duplication, most of the duplicated sequences have diverged significantly, accepting several retroposon insertions and suffering various deletions. The two terminal L1 repeats (of subfamilies L1ME3 and L1M3a) can be discerned, as well as a hybrid L1 repeat between the two duplication arms. Two pairs of segments within the duplication display significantly higher degrees of similarity. These are the intronless coding region and an upstream segment suggested to include a noncoding exon, as well as a putative control region (see below). Excluding these more conserved segments, as well as later retropositions, the estimated substitution level from the original sequence is 15–20%, which corresponds to 56–65 million years ago. This is consistent with the older age (80–90 million years) of the L1M repeats flanking it. It is remarkable that in both tandem duplication events described, the coding region resides in the middle of the duplicated segment, while the putative control region is located in close proximity to its 5' end. The short distance between the retroposons involved in the duplication mechanisms, and the gene control elements, suggests their location in a structurally more exposed region, potentially yielding an implicit mechanism for duplication of complete gene structures.

*Sequence expansion by retroposition.* An additional, similarly aged (58–65 million years old) tandem duplication can be discerned, mediated by mammalian-wide L1 repeats and including the complete OR17-6 and OR17-7 (boxed in Fig. 4). The duplicated sequences have also diverged significantly and expanded significantly, from 8–10 to 17–20 kb per duplication arm. This sequence expansion is due to repeated retroposon invasion. An even stronger sequence expansion can be observed following the OR17-4/OR17-31 duplication, with the region surrounding OR17-4 expanding from ~7 to ~30 kb. Most of the added sequence derives from L1 repeats, which enter both the intron and the intergenic sequence.

*A recent dispersive duplication.* The OR cluster region also contains the results of a very recent event of gene duplication in which 30 kb of sequence containing a full OR gene were copied, within a distance of ~160 kb. Comparison of the genomic sequences surrounding OR17-30 and OR17-31 by GESTALT (Figs. 5a and 5b), dot-plot, and identity plot (Fig. 5c) shows the existence of two distinct regions of similarity: one covers ~24 kb of sequence with >99% nucleotide sequence identity, and the other covers ~8 kb with somewhat lower sequence conservation ( $95 \pm 3\%$ ). Both segments include a variety of repetitive sequences. The first duplication





**FIG. 5.** Gene duplications in subfamily 1D. (a) Genomic region of OR17-4 and OR17-31; partial GESTALT map of genes and repeats as in Fig. 4. The old L1 repeats postulated to mediate the duplication event are indicated by arrows. (b) Map of the OR30/OR31 gene jumping and conversion events. The sequence segment including OR17-30 is reverse-complemented with respect to the absolute cluster orientation. Thick horizontal dashed lines indicate the extents of the recombinatorial events. Vertical shaded lines are an aid for visualization. (c) Identity plot of the duplicated segments including OR17-31 and OR17-30. Depiction of the hypothesis of extensive ectopic copying of 30 kb of sequence (currently 95% identical) followed by the homogenization of 24 kb (currently 99% identical).

segment (99% identity) includes OR17-30 or OR17-31 in its entirety (coding region, upstream intron, noncoding exon, and putative control region). Consistent with the high identity level of this region, no additional repetitive elements have retroposed into it, following the duplication. On the other hand, a young *Alu* repeat (7.1% divergent from *AluY* consensus, ~50 Myr old) has retroposed into the second segment of the OR17-30 copy but not into its OR17-31 counterpart.

To analyze the mechanism leading to this duplication, we examined the sequences at the ends of the duplicated regions. A short (55 bp), very young L1PA5 repeat that flanks the OR17-30 segment at its telomeric end is followed by a 265-bp-long A+T-rich simple-sequence repeat. No short direct repeats flank the L1PA5 element, even though it is a very recent insertion. This L1PA5 retroposon also is not present at the corresponding end of the OR17-31 segment, even though its age is comparable with the divergence between the older duplicated segments. Retroposons enter the genome at specific sites, causing staggered, double-strand breaks (Jurka, 1997). Up to 8 kb of non-homologous ectopic sequence were shown to be copied in P-element-induced double-strand gap repair in *Drosophila* (Nassif *et al.*, 1994). We hypothesize here that such a mechanism acted in the primate genome using the genomic surroundings of OR17-31 as template. The end result is the duplication of the 30-kb segment, with OR17-31 being the original and OR17-30 being the new

copy. A later homogenization event then might have copied the 24-kb sequence including the complete gene, yielding the current structure. Since the sequence homogenized in this later event is entirely contained in the older, larger duplicated segment, the direction of transfer cannot be ascertained.

#### Cluster Organization and Evolution

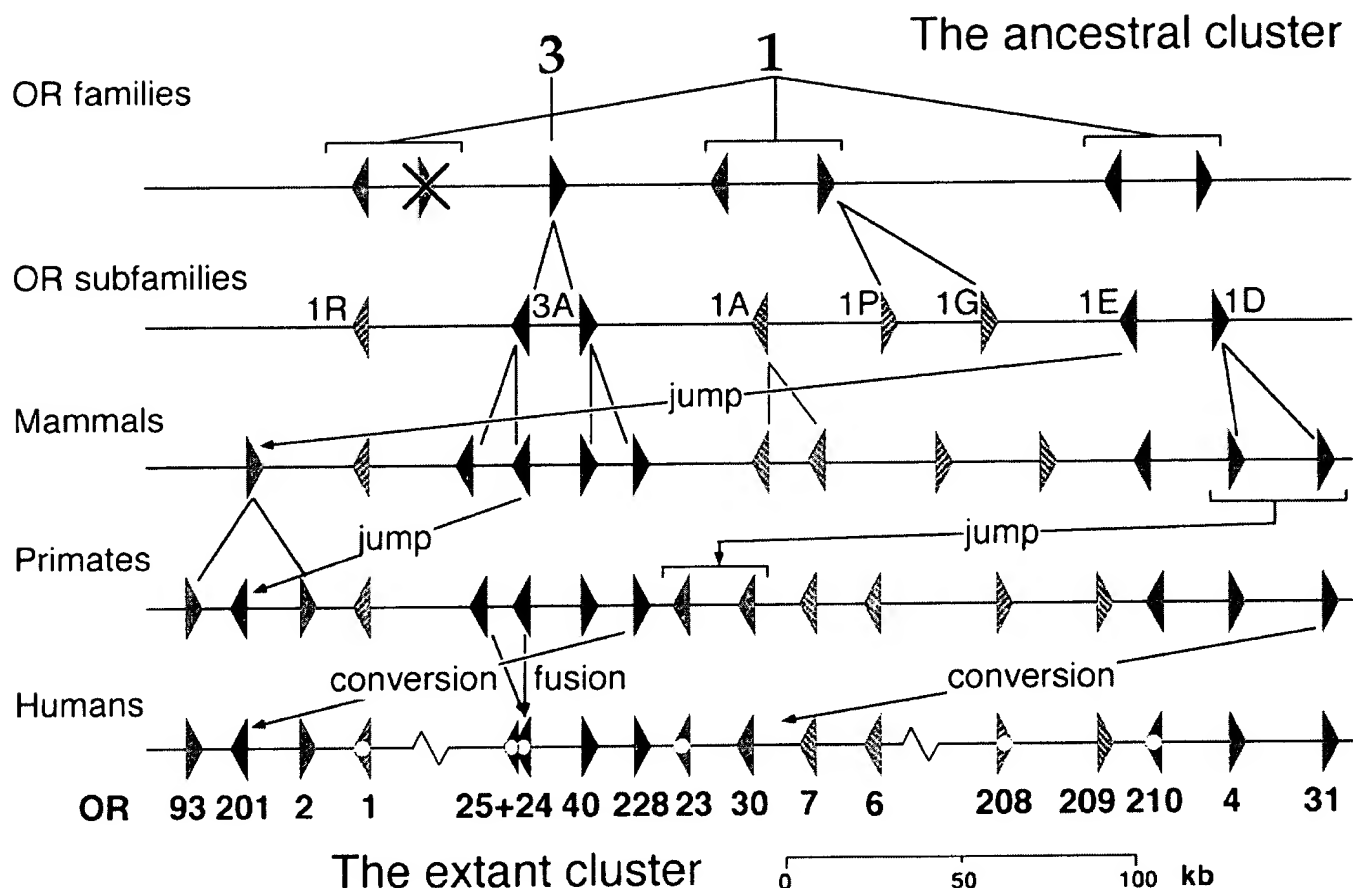
**Reconstruction of cluster history.** The OR gene cluster under study has a very complex organization with genes lying in both orientations: eight genes from centromere to telomere and nine genes from telomere to centromere. A very weak correlation (0.45) can be seen between the orientation of each OR region and whether a gene is apparently functional or is a pseudogene. This suggests the absence of a single, directional "locus control region" for the entire cluster, as it would dictate a preferred orientation for functional genes.

Representatives of seven gene subfamilies are intermixed along the cluster. This is in sharp contrast with the largely unidirectional organization of many known multigene clusters, e.g., homeobox genes (Garcia-Fernandez and Holland, 1994),  $\beta$ -like globins (Fritsch *et al.*, 1980), and also ORs on human chromosome 3 (Brand-Arpon *et al.*, 1999). This uniform cluster organization usually results from repeated tandem duplications and may be functionally important.

The arrangement of the OR genes in the present cluster may be minimally explained by a rather com-







**FIG. 6.** A hypothetical reconstruction of the evolutionary history of the cluster, indicating duplication, jumping, and conversion events. Gene location, orientation, and pseudogenic status as in Fig. 1. The scale applies only to the map of the extant human cluster. See text for details.

plex series of evolutionary events, including repeated tandem duplications, copying of genes to remote locations within the cluster ("gene jumping"), repeated conversion events, and gene death by point mutation, deletion, and recombination. Based on the family/subfamily classification of the genes in the cluster, and on the estimated times for each duplication event, the possible evolutionary history of the cluster can be reconstructed (Fig. 6). It is likely that an ancestral cluster, composed of only two oppositely oriented genes of family 1, was tandemly duplicated, with each resulting gene becoming a subfamily founder. Later, several local duplication events and gene rearrangements most likely occurred within the cluster, as evidenced by their current high degrees of similarity.

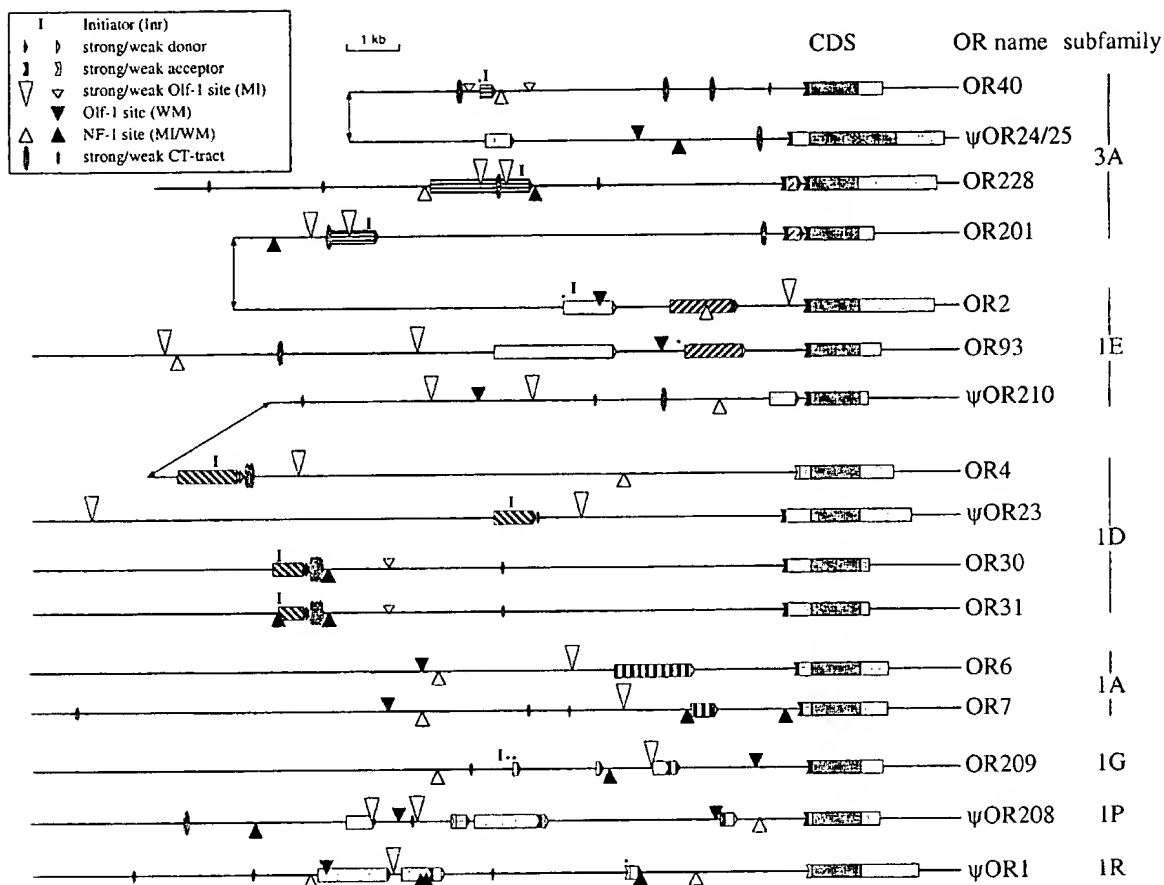
The presence of members of family 3 within the cluster most likely occurred because, as depicted in Fig. 6, following the initial duplication of the ancestral two-gene cluster, one of the genes (crossed out in Fig. 6) was replaced (e.g., by conversion) by an "invading" family 3 founder gene. Alternatively, the ancestral cluster may have included the founder family 3 gene in addition to the family 1 members. The subfamily 1R founder may then represent an additional, ancient gene rearrangement event. To clarify this, it will be necessary to characterize the orthologous cluster in more remote vertebrate species (Lapidot *et al.*, in prep-

aration). While comparison to a paralogous cluster that contains family 3 genes would also be informative, this is currently impossible, since only one additional family 3 member has been described in the human genome to date (OR5-83, see below).

Intriguingly, the family 3 "domain" in the middle of the cluster is on average more G+C-rich (42.9%) than the family 1 domains (40.2 and 40.7% centromeric and telomeric to the 3A region, respectively). Moreover, family 3 coding regions are in general more G+C-rich than family 1 members (Table 1). These observations suggest that the founder family 3 gene derived from a different genomic environment characterized by a higher G+C content, i.e., an H-type isochoire (Bernardi, 1993). After integration into the L isochoire of this cluster, the composition of the originally G+C-rich sequence apparently has changed to reflect that of the new environment, but the original G+C richness is still apparent, especially in the coding regions.

Several events can be discerned in which a gene is duplicated to a remote location along the cluster (i.e., gene jumping), which account for most of the intermixing of subfamilies. Such events could involve gene retroposition (Brosius, 1999). Some of the duplication events involving genes of the same subfamily are mediated by mammalian-wide repetitive elements (MIR and LIM). Since these likely occurred over 100 million





**FIG. 7.** Predicted OR gene structures. Dark gray boxes represent OR open reading frames for coding sequences (CDS). Light gray boxes represent the nontranslated parts of coding exon, from the predicted splicing acceptors to the predicted sites for polyadenylation. Predicted groups of upstream noncoding exons with similar sequences are denoted by boxes filled with identical patterns. Light gray upstream exons do not show similarity to any known OR genomic sequences. Upstream exons begin at predicted TSSs and end at predicted splicing acceptors. TSSs predicted by two programs at the same location are denoted by asterisks. MI, MatInspector. WM, WordMapper.

years ago, this gene cluster was established significantly before the mammalian radiation, potentially at the amphibian stage. The ancestral mammalian cluster is therefore predicted to have included 8–13 genes (Fig. 6). Since then, the genes in this cluster apparently have undergone little further amplification by repeated tandem duplication, in the primate lineage.

On the other hand, there is evidence for recent genetic exchange with other genomic loci, with several instances of genes from this cluster being copied into other chromosomes. The genomic clone G1 (Selbie *et al.*, 1992) is almost identical to OR17-4, but its genomic location is unknown. OR11-13 (*OR1D7P*, GenBank Accession No. AF065866) and OR11-22 (*OR1D6P*, GenBank Accession No. AF065868), on chromosome 11 (Buettner *et al.*, 1998), are >99% identical in nucleotide sequence to OR17-23. OR13-66 (U86222) on chromosome 13 (Rouquier *et al.*, 1998) is identical to OR17-2. Strikingly, OR5-83 (U86272) and OR5-85 (U86274) on chromosome 5 (Rouquier *et al.*, 1998) also are almost identical to OR17-201 and OR17-2, respectively, suggesting that at least 30 kb of chromosome 17 sequence, including genes from two different families (3 and 1), were duplicated into chromosome 5. It is therefore apparent that duplications of single OR genes between different chromosomes are not uncommon,

without necessitating concomitant duplication of extensive genomic regions (Trask *et al.*, 1998).

### The Conserved Structure of OR Genes

To predict the intron–exon structure of the genes in the cluster, including potential upstream noncoding exons, we analyzed the genomic environment of each OR coding region, concentrating on the features conserved between ORs that belong to the same subfamily. One to four upstream, noncoding exons were predicted for each OR gene in the cluster (Fig. 7). Exons contained within repetitive sequences were eliminated from the analyzed set, since we aimed to recognize similarity due to exon conservation, rather than due to similarity between repeats. The sequences of the predicted exons for each OR gene were aligned with the upstream genomic regions of all other ORs from the same subfamily, to recognize potential upstream exons conserved between ORs that belong to the same subfamily. In general, the noncoding exons predicted for genes of a given subfamily displayed sequence similarity, but the upstream exons of genes from different subfamilies or different families were much more divergent.



**Subfamily 3A.** The previously predicted upstream exon for OR17-40 and OR17-228 (Glusman *et al.*, 1996) also was present in OR17-201. An additional short exon was predicted for OR17-201 and OR17-228, in close proximity to the coding exon.

**Subfamily 1D.** An upstream exon was predicted for the four ORs from subfamily 1D (OR17-4, OR17-23, OR17-30, and OR17-31). The potential upstream exon for pseudogene OR17-23 was identified only by fex and GenScan.

**Subfamily 1E.** A single upstream exon was predicted for OR17-93. Its counterpart upstream of OR17-2 was predicted only by fex. It is worth noting that this predicted exon is located within a very old L2 repeat, which apparently was present before the gene duplication leading to OR17-2 and OR17-93. Part of this ancient repeat may have adopted a structural function as an upstream, noncoding exon. Regions of similarity between these two genomic sequences that contain no predicted exons are shown as open boxes in Fig. 7. The genomic sequence surrounding the OR17-210 pseudogene does not show any significant similarity with the upstream sequences of OR17-2 or OR17-93.

**Subfamily 1A.** One of the three upstream exons predicted for OR17-7 shows sequence similarity with the upstream exon predicted for OR17-6 (recognized only by Grail).

**Subfamilies 1R, 1P, and 1G.** OR17-1 and OR17-209 have three predicted upstream exons, while one upstream exon is predicted for OR17-208 (Fig. 7). Since full genomic sequences of additional ORs from subfamilies 1R, 1P, and 1G are unknown, further subfamily comparative analysis for OR17-1, OR17-208, and OR17-209 could not be performed.

**Prediction of splicing sites.** The two splice site prediction programs (SPL and SSPNN) complemented the exon prediction programs as they can detect potential cryptic or suboptimal sites. Splice acceptor sites were found to be localized 6–471 bp upstream to the start codon of all analyzed ORs (Fig. 7). The coding exons of two genes (OR17-4 and OR17-1) had weak acceptor sites with scores less than 0.70 according to SPL and less than 0.80 according to SSPNN. Acceptor sites also were predicted for the putative internal upstream exons of OR17-201, OR17-228, OR17-1, OR17-208, and OR17-209.

Donor splice sites for upstream exons were detected by the SPL program (score for weak sites less than 0.85). Interestingly, "donor doublets" were predicted for the upstream exons of all subfamily 1D ORs (OR17-4, OR17-23, OR17-30, and OR17-31). The observed donor doublet consensus sequence is GCAG-mACrGAgCAsTGG**GT**AGG**GT**SyGkmyrbCTCAGsCy, where the boldface, underlined GTs five nucleotides apart represent the alternative splicing donors, and capitalized bases are conserved in the four sequences

studied. This suggests that alternative splicing occurs in this subfamily.

**Prediction of polyadenylation signals.** A POLYAH predicted (Solovyev and Salamov, 1997) polyadenylation site occurs 3' to the coding region for each OR gene in the cluster, indicating 3'-UTRs of 200 to 1500 bp (Fig. 7).

**Prediction of transcription start sites.** Potential promoters and corresponding transcription start sites (TSSs) were predicted by TSSG and TSSW (Solovyev and Salamov, 1997) and by PPNN (Reese *et al.*, 1996). The TSSs predicted by both PPNN and by either TSSG or TSSW are marked as asterisks in Fig. 7. In addition, the very highly scoring TSS predicted for one of the upstream exons of OR17-209 is indicated by a double asterisk in Fig. 7. The predicted promoters are all TATA-less, like the promoters of other olfactory-specific genes (Wang *et al.*, 1993) and as suggested by the preliminary analysis (Glusman *et al.*, 1996). Initiator (Inr) sequences (Javahery *et al.*, 1994) are present in the upstream regions of ORs from subfamilies 3A (excluding the OR17-24 pseudogene), and 1D, as well as OR17-2 and OR17-209 (Fig. 7). The predicted Inr sites do not coincide with the promoters predicted by TSSG and TSSW but are located within 800 bp of suitable splice donor sites.

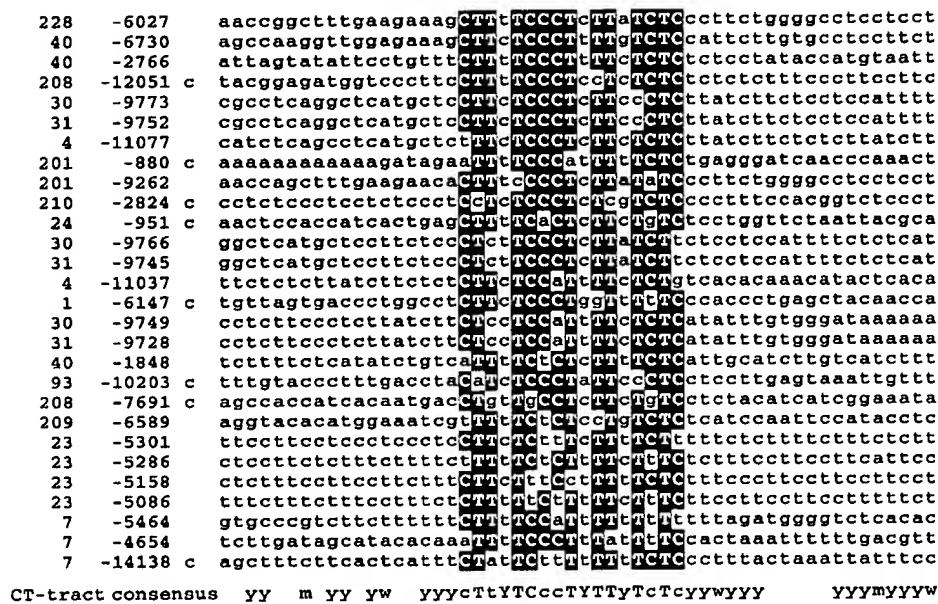
#### Potential Transcriptional Control Signals

The availability of the complete sequence of the cluster provided us with the first opportunity to compare the upstream genomic regions for the OR genes that are clustered and that might be expected to share common control features. A dot-plot and ClustalX alignment comparison of the 15 kb upstream from each of 16 OR ORFs in the cluster (no upstream sequences are available for OR17-25) showed significantly conserved segments within subfamilies, but no extensive sequence conservation of upstream regions either between subfamilies or between families. It is apparent, therefore, that genes belonging to different subfamilies have diverged significantly in their upstream regions.

**No recombinatorial signal sequences.** It can be hypothesized that the clonal exclusion of ORs is at least partially based on somatic recombination, which would then join an OR gene to a putative locus control region. Somatic recombination joins gene segments in immunoglobulin heavy-chain genes via recombinatorial signal sequences, or RSSs (Sakano *et al.*, 1981). The WordMapper tool was used to detect such signals in this cluster. No suitable RSSs were found in the genomic environments upstream of the OR coding regions.

**Detection of a specific CT tract.** A global comparison of all 16 sequences found, as expected, significantly shared patterns among members of each subfamily. Seven of the 16 genes were therefore selected as representatives of the different subfamilies for further analysis (OR17-7, OR17-31, OR17-2, OR17-209, OR17-





**FIG. 8.** Multiple alignment of the CT-tract sequences, listing gene name, pattern position relative to the ATG codon, orientation ("c" for complementary strand), and actual sequence. In the consensus line, uppercase indicates consensus by plurality of 85 or 90% for unambiguous and ambiguous bases, respectively. Y denotes pyrimidines; M denotes A or C; W denotes A or T. Shaded bases indicate matches to the consensus in positions where the consensus is unambiguous.

208, OR17-1, and OR17-40, for subfamilies 1A, 1D, 1E, 1G, 1P, 1R, and 3A, respectively). The genomic environments of the 7 selected genes were examined with the oligonucleotide analysis tool (van Helden *et al.*, 1998) from the Yeast Regulatory Tools (van Helden *et al.*, in preparation), using pattern length of 8. As expected, the highest scores (representing patterns present in most of the sequences) corresponded to patterns that are part of *Alu* repeats. Ignoring these, the highest scoring patterns were seen for pyrimidine:purine (Y:R) tracts, the CA repeat, and CpG-containing patterns. A similar analysis on sequences in which interspersed repeats were premasked again gave highest scores to Y:R tracts. Similar results were obtained by analyzing both strands simultaneously (not shown).

When the segment pair overlap method of MACAW (Schuler *et al.*, 1991) was used to detect longer conserved sequences, a pyrimidine-rich segment (hereafter named CT tract) with consensus CTTYTCCCTYTT-NTCTCY was found. Using the Word Mapper tool of the GESTALT Workbench, the positions with significant similarity to this consensus were detected and mapped (Figs. 7 and 8) and also could be correlated with the predicted splice donor sites in a subfamily-specific fashion. Specifically, the CT tract is contained within the putative control region conserved in genes of subfamily 3A (Glusman *et al.*, 1996), as well as in the noncoding conserved sequences of subfamily 1D.

To study the generality of these findings, the Gibbs sampler method was used through the Web interface of the Yeast Regulatory Tools (van Helden *et al.*, in preparation). Using patterns of various lengths, but especially  $\geq 30$ , only Y:R tracts that comap with the CT-tract motif detected using MACAW were detected. The sequences surrounding the CT tracts are enriched in C+T beyond the specific consensus sequence described (Fig. 8).

Therefore, the most significant pattern common to most potential control regions, beyond trivial similarities deriving from either historical conservation (between genes in one subfamily) or sequence repetition (of retrotransposons), was the presence of pyrimidine:purine tracts, which are located near splice donors. The CT tracts could in principle be an olfactory-specific recombinatorial signal. On the other hand, their location 3' to the putative upstream exons weakens this possibility, as such exons and splicing signals would be missing from the selected gene.

Pyrimidine:purine tracts have been shown to promote unwinding of the double-helix (Bucher and Yagil, 1991) and to be implicated in regulation of transcription and in posttranslational regulation (Valcarcel and Gebauer, 1997). Within the observed tracts, a specific motif (CT tract) could be defined as consensus, suggesting the conservation of specific patterns for transcription factor binding.

**Mapping of transcription factor binding sites.** Two families of transcription factors are expressed in the neurons of the olfactory epithelium: the O/E family, including Olf-1, Olf-2, and Olf-3 (Wang *et al.*, 1997); and the NF-1 family (Baumeister *et al.*, 1999). Olf-1 and NF-1 binding has been demonstrated for promoters of the olfactory-specific genes: OMP, type III adenylyl cyclase, and olfactory cyclic nucleotide gated channel. For  $G_{\text{olfa}}$ , only Olf-1 binding has been shown (Wang *et al.*, 1993; Baumeister *et al.*, 1999). Several potential binding sites for O/E and NF-1 transcription factors now have been identified in the genomic surroundings (up to 15 kb upstream) of each OR gene in the cluster (Fig. 7).

Using MatInspector, one or two Olf-1 sites were found with scores above 0.850 for most of the analyzed





ORs (Fig. 7). Predicted Olf-1 sites for OR17-40, OR17-30, and OR17-31 have scores from 0.820 to 0.835. Additional Olf-1 sites were observed upstream of OR17-24, OR17-2, OR17-93, OR17-210, OR17-6, OR17-7, OR17-209, OR17-208, and OR17-1 when mapping the Olf-1 consensus using the Word Mapper tool. Generally, the Olf-1 sites for these ORs were predicted with a lower score than Olf-1 sites for other olfactory neuron-specific genes. This most likely is because the previously described Olf-1 sites were located in the rat genomic sequences, with the sole exception of the human OMP Olf-1 site (Buiakova *et al.*, 1994). Therefore, a low score for human predicted Olf-1 sites might reflect interspecies differences. In addition, Olf-1, Olf-2, and Olf-3 bind to Olf-1 sites of olfactory neuron-specific genes with different affinity (Wang *et al.*, 1997). Thus, it is likely that different members of the O/E transcription factor family bind *in vivo* to OR Olf-1 and to other Olf-1 sites. Except for the OR17-23 pseudogene, all analyzed gene upstream regions were found to contain strong potential NF-1 binding sites, but no conserved patterns for NF-1 localization could be distinguished within the analyzed OR subfamilies.

### CONCLUSIONS

A large human genomic region including a cluster of 17 genes of the OR superfamily has now been fully sequenced and characterized. The only potential non-OR gene identified was at the telomeric margin, suggesting that this uninterrupted cluster evolved by repeated expansion. The inferred primordial cluster, suggested to have been established in an early amphibian ancestor, presumably included only a few OR genes, which gave rise to the two different gene families observed in the extant sequence. The cluster has not evolved by simple tandem multiplication of its initial components, but has apparently grown in complexity by several recombinatorial events, some of which are relatively recent. For some of the recombinations, a mechanism may be discerned, involving interspersed repeats (retrotransposons). The interspersed repeats represent 60% of the sequence in the cluster and belong mainly to the LINE family of retrotransposons, though SINEs and DNA transposons are also present. The intergenic distances vary significantly (5–67 kb) and are related to the amount of inserted repetitive sequences. At this stage, it is unclear whether repetitive sequences within the OR genes affect their expression to any extent.

Significantly, the observed recombinatorial events involve complete genes, suggesting an evolutionary mechanism for preserving intact gene structures upon duplication. The common gene structure has been delineated by computational analysis of the OR genes. This was found to include an intronless terminal coding exon, terminated by a signal for polyadenylation

(0.15–1.5 kb downstream from the stop codon) and preceded by introns (0.5–11 kb long) and by one or two short, noncoding upstream exons. The resulting common gene structure is consistent with that which we previously described for OR genes belonging to family 3, with the addition of the possible existence of more than one upstream noncoding exon for each gene. The functional role of this stereotyped structure is still unknown. The upstream noncoding exons might play a role in the control of mRNA fate or subcellular localization.

When the complete genes in this OR cluster are compared, several levels of conservation may be discerned. Within each subfamily, the coding sequences are most conserved, the putative control regions and noncoding upstream exons show an intermediate level of conservation, while the introns and the intergenic sequences are the least conserved. Between subfamilies, the overall intron–exon structure of the genes is more conserved than the specific location and the quality of the relevant splice signals, while the putative control sequences are the most divergent, with only their pyrimidine:purine tracts and Olf-1 transcription factor binding sites conserved. The Olf-1 transcription factor binding sites may play an important role in olfactory-specific transcription of the OR genes, while the pyrimidine:purine tracts, previously shown to promote melting of the double-helix for transcription initiation, may serve an auxiliary control function.

A sizable fraction (6 of 17) of the coding regions in the cluster are pseudogenes. One of these (OR17-1) apparently has shifted function to become a CpG island. Other examples are known where OR genes adopted new, noncoding functions, e.g., promoters and matrix attachment regions. This appears to indicate that OR coding regions have a special plasticity, allowing them to evolve new functionalities. A potential explanation of this versatility, as well as the prevalence of pseudogenes, may reside in the variability within the OR superfamily and the partial functional redundancy of OR genes.

Clustering of the OR genes may play an important role for initiation of their transcription by common enhancers. Each of the identified OR genes appears to have its own, independent TATA-less promoter region. This finding and the apparent lack of recombinatorial signal sequences suggest the importance of *trans*-acting factors for regulating the excluded cellular expression of single OR genes in the cluster, rather than a somatic DNA rearrangement mechanism. The cluster includes CpG islands, potentially affecting OR gene expression. Two of the observed CpG islands derive from recently inserted SVA retroviral elements, presumably absent from the genomes of New World monkeys and other mammals. Further work will be required to ascertain the functional role of these potential regulatory signals.



## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Dror Sharon, Dr. Irit Rubin, and Yitzhak Pilpel for fruitful discussions and valuable suggestions, and Dr. Jaime Prilusky for unwavering support. Doron Lancet holds the Ralph and Lois Chair in Neurogenetics and is supported by the Crown Human Genome Center, a Ministry of Science grant to the National Laboratory for Genome Infrastructure, the National Institutes of Health (DC00305), the Krupp Foundation, the German-Israeli Foundation for scientific research and development, and the Glasberg, Levy, Nathan, Brunschweig, and Levine funds.

## REFERENCES

- Asai, H., Kasai, H., Matsuda, Y., Yamazaki, N., Nagawa, F., Sakano, H., and Tsuboi, A. (1996). Genomic structure and transcription of a murine odorant receptor gene: Differential initiation of transcription in the olfactory and testicular cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **221**: 240–247.
- Bailey, W. J., Fitch, D. H., Tagle, D. A., Czelusniak, J., Slightom, J. L., and Goodman, M. (1991). Molecular evolution of the psi eta-globin gene locus: Gibbon phylogeny and the hominoid slowdown. *Mol. Biol. Evol.* **8**: 155–184.
- Barth, A. L., Dugas, J. C., and Ngai, J. (1997). Noncoordinate expression of odorant receptor genes tightly linked in the zebrafish genome. *Neuron* **19**: 359–369.
- Baumeister, H., Gronostajski, R. M., Lyons, G. E., and Margolis, F. L. (1999). Identification of NF1-binding sites and cloning of NF1-cDNAs suggest a regulatory role for NF1 transcription factors in olfactory neuron gene expression. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **72**: 65–79.
- Ben-Arie, N., Lancet, D., Taylor, C., Khen, M., Walker, N., Ledbetter, D. H., Carrozzo, R., Patel, K., Sheer, D., Lehrach, H., and North, M. A. (1994). Olfactory receptor gene cluster on human chromosome 17: Possible duplication of an ancestral receptor repertoire. *Hum. Mol. Genet.* **3**: 229–235.
- Ben-Arie, N., North, M., Khen, M., Gross-Isserof, R., Walker, N., Horn-Saban, S., Gat, U., Natchin, M., Lehrach, H., and Lancet, D. (1993). "Olfactory Receptor: from Signal Modulation to Human Genome Mapping." Vol. 1, pp. 122–126, Springer-Verlag, Berlin/New York, Koseinenkin Kaikan, Sapporo, Japan.
- Bernardi, G. (1993). The isochore organization of the human genome and its evolutionary history—A review. *Gene* **135**: 57–66.
- Bodenteich, A., Chissoe, S., Wang, Y. F., and Roe, B. A. (1993). Shotgun cloning as the strategy of choice to generate templates for high-throughput dideoxynucleotide sequencing. In "Automated DNA Sequencing and Analysis Techniques" (J. C. Venter, Eds.), pp. 42–50, Academic Press, London.
- Brand-Arpon, V., Rouquier, S., Massa, H., de Jong, P. J., Ferraz, C., Ioannou, P. A., Demaille, J. G., Trask, B. J., and Giorgi, D. (1999). A genomic region encompassing a cluster of olfactory receptor genes and a myosin light chain kinase (MYLK) gene is duplicated on human chromosome regions 3q13–q21 and 3p13. *Genomics* **56**: 98–110.
- Brandeis, M., Frank, D., Keshet, I., Siegfried, Z., Mendelsohn, M., Nemes, A., Temper, V., Razin, A., and Cedar, H. (1994). Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature* **371**: 435–438.
- Britten, R. J. (1994). Evolutionary selection against change in many Alu repeat sequences interspersed through primate genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 5992–5996.
- Brosius, J. (1999). Many G-protein-coupled receptors are encoded by retrogenes. *Trends Genet.* **15**: 304–305.
- Brunak, S., Engelbrecht, J., and Knudsen, S. (1991). Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence. *J. Mol. Biol.* **220**: 49–65.
- Bucher, P., and Yagil, G. (1991). Occurrence of oligopurine · oligopyrimidine tracts in eukaryotic and prokaryotic genes. *DNA Seq.* **1**: 157–172.
- Buck, L., and Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell* **65**: 175–187.
- Buettner, J. A., Glusman, G., Ben-Arie, N., Ramos, P., Lancet, D., and Evans, G. A. (1998). Organization and evolution of olfactory receptor genes on human chromosome 11. *Genomics* **53**: 56–68.
- Buiakova, O. I., Krishna, N. S., Getchell, T. V., and Margolis, F. L. (1994). Human and rodent OMP genes: Conservation of structural and regulatory motifs and cellular localization. *Genomics* **20**: 452–462.
- Burge, C., and Karlin, S. (1997). Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *J. Mol. Biol.* **268**: 78–94.
- Carver, E. A., Issel-Tarver, L., Rine, J., Olsen, A. S., and Stubbs, L. (1998). Location of mouse and human genes corresponding to conserved canine olfactory receptor gene subfamilies. *Mamm. Genome* **9**: 349–354.
- Chalifa-Caspi, V., Rebhan, M., Prilusky, J., and Lancet, D. (1997). The Unified Database (UDB): A novel genome integration concept. *Genome Digest* **4**: 15.
- Chess, A., Simon, I., Cedar, H., and Axel, R. (1994). Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression. *Cell* **78**: 823–834.
- Chissoe, S. L., Bodenteich, A., Wang, Y.-F., Wang, Y.-P., Burian, D., Clifton, S. W., Crabtree, J., Freeman, A., Iyer, K., Li, J. A., Ma, Y., McLaury, H.-J., Pan, H.-Q., Sarhan, O., Toth, S., Wang, Z., Zhang, G., Heisterkamp, N., Groffen, J., and Roe, B. A. (1995). Sequence and analysis of the human ABL gene BCR gene and regions involved in the Philadelphia chromosomal translocation. *Genomics* **27**: 67–82.
- Crowe, M. L., Perry, B. N., and Connerton, I. F. (1996). Olfactory receptor-encoding genes and pseudogenes are expressed in humans. *Gene* **169**: 247–249.
- Engels, W. R. (1993). Contributing software to the internet: The Amplify program. *Trends Biochem. Sci.* **18**: 448–450.
- Fritsch, E. F., Lawn, R. M., and Maniatis, T. (1980). Molecular cloning and characterization of the human beta-like globin gene cluster. *Cell* **19**: 959–972.
- Garcia-Fernandez, J., and Holland, P. W. (1994). Archetypal organization of the amphioxus Hox gene cluster. *Nature* **370**: 563–566.
- Gardiner, K. (1995). Human genome organization. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **5**: 315–322.
- Gentles, A. J., and Karlin, S. (1999). Why are human G-protein-coupled receptors predominantly intronless? *Trends Genet.* **15**: 47–49.
- Gimelbrant, A. A., and McClintock, T. S. (1997). A nuclear matrix attachment region is highly homologous to a conserved domain of olfactory receptors. *J. Mol. Neurosci.* **9**: 61–63.
- Glusman, G., Clifton, S., Roe, R., and Lancet, D. (1996). Sequence analysis in the olfactory receptor gene cluster on human chromosome 17: Recombinatorial events affecting receptor diversity. *Genomics* **37**: 147–160.
- Glusman, G., Sharon, D., Kalush, F., Clifton, S., Roe, B., Ferraz, C., Demaille, J., Ben-Asher, E., and Lancet, D. (1998). Genome dynamics, polymorphisms and mutations in a 350 kb human olfactory receptor gene cluster. *Math. Model. Sci. Comput.* **9**: 30–44.
- Hanke, J. H., Hambor, J. E., and Kavathas, P. (1995). Repetitive Alu elements form a cruciform structure that regulates the function of the human CD8 alpha T cell-specific enhancer. *J. Mol. Biol.* **246**: 63–73.
- Higgins, D. G., Thompson, J. D., and Gibson, T. J. (1996). Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods Enzymol.* **266**: 383–402.
- Ioannou, P. A., Amemiya, C. T., Garnes, J., Kroisel, P. M., Shizuya, H., Chen, C., Batzer, M. A., and de Jong, P. J. (1994). A new



- bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nat. Genet.* **6**: 84–89.
- Issel Tarver, L., and Rine, J. (1996). Organization and expression of canine olfactory receptor genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 10897–10902.
- Javahery, R., Khachi, A., Lo, K., Zenzie-Gregory, B., and Smale, S. T. (1994). DNA sequence requirements for transcriptional initiator activity in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 116–127.
- Jukes, T. H., and Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. In "Mammalian Protein Metabolism" (H. N. Munro, Eds.), pp. 21–123, Academic Press, New York.
- Jurka, J. (1997). Sequence patterns indicate an enzymatic involvement in integration of mammalian retrotransposons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 1872–1877.
- Karlin, S., Campbell, A. M., and Mrazek, J. (1998). Comparative DNA analysis across diverse genomes. *Annu. Rev. Genet.* **32**: 185–225.
- Kulp, D., Haussler, D., Reese, M. G., and Eeckman, F. H. (1996). A generalized hidden Markov model for the recognition of human genes in DNA. *Ismb* **4**: 134–142.
- Lancet, D. (1986). Vertebrate olfactory reception. *Annu. Rev. Neurosci.* **9**: 329–355.
- Lancet, D. (1991). Olfaction. The strong scent of success. *Nature* **351**: 275–276. [News]
- Lancet, D., Sadosky, E., and Seidemann, E. (1993). Probability model for molecular recognition in biological receptor repertoires: Significance to the olfactory system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 3715–3719.
- Laurent, G. (1997). Olfactory processing: Maps, time and codes. *Curr. Opin. Neurobiol.* **7**: 547–553.
- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., and Buck, L. B. (1999). Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* **96**: 713–723.
- Merino, E., Balbas, P., Puente, J. L., and Bolivar, F. (1994). Antisense overlapping open reading frames in genes from bacteria to humans. *Nucleic Acids Res.* **22**: 1903–1908.
- Mombaerts, P. (1999). Molecular biology of odorant receptors in vertebrates. *Annu. Rev. Neurosci.* **22**: 487–509.
- Nassif, N., Penney, J., Pal, S., Engels, W. R., and Gloor, G. B. (1994). Efficient copying of nonhomologous sequences from ectopic sites via P-element-induced gap repair. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 1613–1625.
- Nikolaev, L. G., Tsevegiyn, T., Akopov, S. B., Ashworth, L. K., and Sverdlov, E. D. (1996). Construction of a chromosome specific library of human MARs and mapping of matrix attachment regions on human chromosome 19. *Nucleic Acids Res.* **24**: 1330–1336.
- Nizetic, D., Zehetner, G., Monaco, A. P., Gellen, L., Young, B. D., and Lehrach, H. (1991). Construction, arraying, and high-density screening of large insert libraries of human chromosomes X and 21: Their potential use as reference libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 3233–3237.
- Page, R. D. (1996). TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* **12**: 357–358.
- Pearson, W. R., Wood, T., Zhang, Z., and Miller, W. (1997). Comparison of DNA sequences with protein sequences. *Genomics* **46**: 24–36.
- Pilpel, Y., Sosinsky, A., and Lancet, D. (1998). Molecular biology of olfactory receptors. *Essays Biochem.* **33**: 93–104.
- Qasba, P., and Reed, R. R. (1998). Tissue and zonal-specific expression of an olfactory receptor transgene. *J. Neurosci.* **18**: 227–236.
- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E., and Werner, T. (1995). MatInd and MatInspector: New fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res.* **23**: 4878–4884.
- Raja, M., Zevin-Sonkin, D., Schwartzburd, J., Rozovskaya, T. A., Sobolev, I. A., Chertkov, O., Ramanathan, V., Lvovsky, L., and Ulanovsky, L. E. (1997). DNA sequencing using differential extension with nucleotide subsets (DENS). *Nucleic Acids Res.* **25**: 800–805.
- Reese, M. G., Harris, N. L., and Eeckman, F. H. (1996). "Large Scale Sequencing Specific Neural Networks for Promoter and Splice Site Recognition," World Scientific, Singapore.
- Ressler, K. J., Sullivan, S. L., and Buck, L. B. (1993). A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell* **73**: 597–609.
- Rouquier, S., Taviaux, S., Trask, B. J., Brand-Arpon, V., van den Engh, G., Demaille, J., and Giorgi, D. (1998). Distribution of olfactory receptor genes in the human genome. *Nat. Genet.* **18**: 243–250.
- Rowen, L., and Koop, B. F. (1994). Zen and the art of large-scale genomic sequencing. In "Automated DNA Sequencing and Analysis" (M. D. Adams, C., Fields, and J. C. Venter, Eds.), pp. 167–174, Academic Press, New York.
- Rychlik, W. (1995). Selection of primers for polymerase chain reaction. *Mol. Biotechnol.* **3**: 129–134.
- Sakano, H., Kurosawa, Y., Weigert, M., and Tonegawa, S. (1981). Identification and nucleotide sequence of a diversity DNA segment (D) of immunoglobulin heavy-chain genes. *Nature* **290**: 562–565.
- Schuler, G. D., Altschul, S. F., and Lipman, D. J. (1991). A workbench for multiple alignment construction and analysis. *Proteins* **9**: 180–190.
- Selbie, L. A., Townsend Nicholson, A., Iismaa, T. P., and Shine, J. (1992). Novel G protein-coupled receptors: A gene family of putative human olfactory receptor sequences. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **13**: 159–163.
- Sharon, D., Glusman, G., Pilpel, Y., Khen, M., Gruetzner, F., Haaf, T., and Lancet, D. (1999). Primate evolution of an olfactory receptor cluster: Diversification by gene conversion and recent emergence of pseudogenes. *Genomics* **61**: 24–36.
- Shen, L., Wu, L. C., Sanlioglu, S., Chen, R., Mendoza, A. R., Dangel, A. W., Carroll, M. C., Zipf, W. B., and Yu, C. Y. (1994). Structure and genetics of the partially duplicated gene RP located immediately upstream of the complement C4A and the C4B genes in the HLA class III region. Molecular cloning, exon-intron structure, composite retroposon, and breakpoint of gene duplication. *J. Biol. Chem.* **269**: 8466–8476.
- Smit, A. F. A., and Green, P. (1997). RepeatMasker at [http://repeat-masker.genome.washington.edu/cgi-bin/RM2\\_req.pl](http://repeat-masker.genome.washington.edu/cgi-bin/RM2_req.pl).
- Solovyev, V., and Salamov, A. (1997). The Gene-Finder computer tools for analysis of human and model organisms genome sequences. *Ismb* **5**: 294–302.
- Solovyev, V. V., Salamov, A. A., and Lawrence, C. B. (1995). Identification of human gene structure using linear discriminant functions and dynamic programming. *Ismb* **3**: 367–375.
- Sullivan, S. L., Adamson, M. C., Ressler, K. J., Kozak, C. A., and Buck, L. B. (1996). The chromosomal distribution of mouse odorant receptor genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 884–888.
- Trask, B. J., Friedman, C., Martin-Gallardo, A., Rowen, L., Akinbami, C., Blankenship, J., Collins, C., Giorgi, D., Iadonato, S., Johnson, F., Kuo, W. L., Massa, H., Morrish, T., Naylor, S., Nguyen, O. T., Rouquier, S., Smith, T., Wong, D. J., Youngblom, J., and van den Engh, G. (1998). Members of the olfactory receptor gene family are contained in large blocks of DNA duplicated polymorphically near the ends of human chromosomes. *Hum. Mol. Genet.* **7**: 13–26.
- Uberbacher, E. C., Xu, Y., and Mural, R. J. (1996). Discovering and understanding genes in human DNA sequence using GRAIL. *Methods Enzymol.* **266**: 259–281.
- Valcarcel, J., and Gebauer, F. (1997). Post-transcriptional regulation: The dawn of PTB. *Curr. Biol.* **7**: R705–R708.
- Vanderhaeghen, P., Schurmans, S., Vassart, G., and Parmentier, M. (1997). Molecular cloning and chromosomal mapping of olfactory receptor genes expressed in the male germ line: Evidence for their



- wide distribution in the human genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**: 283–287.
- van Helden, J., André, B., and Collado-Vides, J. (1998). Extracting regulatory sites from the upstream region of yeast genes by computational analysis of oligonucleotide frequencies. *J. Mol. Biol.* **281**: 827–842.
- van Helden, J., André, B., and Collado-Vides, J. A Web site for the analysis of regulatory sequences in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In preparation.
- Vassar, R., Ngai, J., and Axel, R. (1993). Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. *Cell* **74**: 309–318.
- von Sternberg, R. M., Novick, G. E., Gao, G. P., and Herrera, R. J. (1992). Genome canalization: The coevolution of transposable and interspersed repetitive elements with single copy DNA. *Genetica* **86**: 215–246.
- Walensky, L. D., Ruat, M., Bakin, R. E., Blackshaw, S., Ronnett, G. V., and Snyder, S. H. (1998). Two novel odorant receptor families expressed in spermatids undergo 5'-splicing. *J. Biol. Chem.* **273**: 9378–9387.
- Wang, M. M., Tsai, R. Y., Schrader, K. A., and Reed, R. R. (1993). Genes encoding components of the olfactory signal transduction cascade contain a DNA binding site that may direct neuronal expression. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 5805–5813.
- Wang, S. S., Tsai, R. Y. L., and Reed, R. R. (1997). The characterization of the Olf-1/EBF-like HLH transcription factor family: Implications in olfactory gene regulation and neuronal development. *J. Neurosci.* **17**: 4149–4158.
- Xu, Y., Mural, R., Shah, M., and Uberbacher, E. (1994). Recognizing exons in genomic sequence using GRAIL II. *Genet. Eng.* **16**: 241–253.







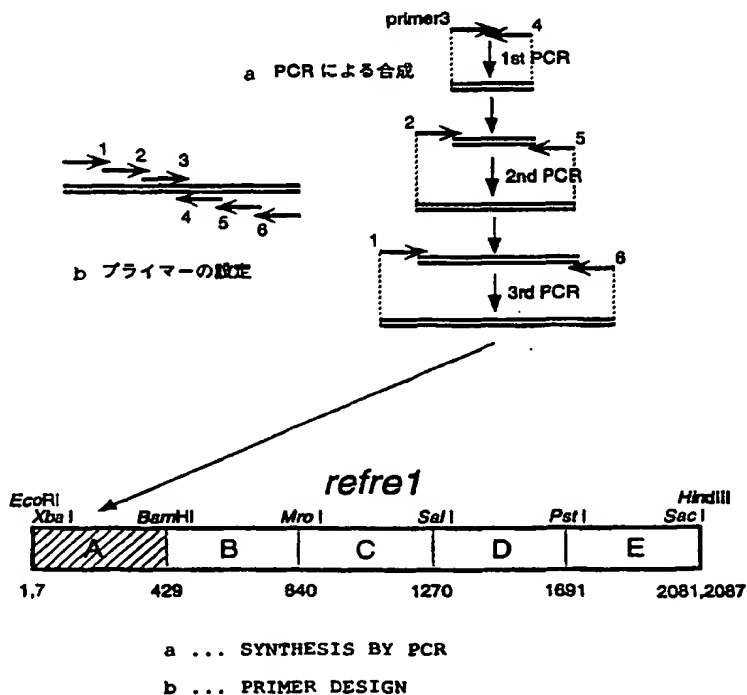
<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>A01H 5/00, C12N 15/09, 15/31</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO99/48356</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 1999年9月30日(30.09.99)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP99/01481  <b>(22) 国際出願日</b> 1999年3月24日(24.03.99)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平10/96637                      1998年3月24日(24.03.98)                      JP  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 科学技術振興事業団(JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION)[JP/JP] 〒332-0012 埼玉県川口市本町四丁目1番8号 Saitama, (JP) <b>(72) 発明者; および</b> <b>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)</b> 森 敏(MORI, Satoshi)[JP/JP] 〒275-0026 千葉県習志野市谷津6-7-2-301 Chiba, (JP) 中西啓仁(NAKANISHI, Hiromi)[JP/JP] 大木宏之(OKI, Hiroyuki)[JP/JP] 山口博隆(YAMAGUCHI, Hirotaka)[JP/JP] 〒113-0032 東京都文京区弥生1-1-1 Tokyo, (JP) <b>(74) 代理人</b> 弁理士 佐伯憲生(SAEKI, Norio) 〒103-0027 東京都中央区日本橋三丁目15番2号 高愛ビル9階 Tokyo, (JP)		<b>(81) 指定国</b> AU, CA, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)  <b>添付公開書類</b> 国際調査報告書

**(54) Title: METHOD FOR TRANSFORMING PLANT, THE RESULTANT PLANT AND GENE THEREOF**

**(54) 発明の名称** 植物を形質転換する方法及びその植物並びにその遺伝子

**(57) Abstract**

A method for achieving the sufficient expression of a gene in a useful higher plant which has been transformed by transferring the above gene encoding a protein having a function carried by another organism so as to impart the function to the plant. Namely, a method for transforming a useful plant by transferring a gene of another species into the plant characterized in that the region of a factor relating to the poly(A) addition of the mRNA of the useful plant to be transformed contained in the base sequence of the gene of the other species is denatured into another base sequence not relating to the poly(A) addition of the mRNA without substantially altering the function of the protein encoded by the gene to be transferred; and a gene usable in the gene transfer.



# (57)要約

本発明は、有用な高等植物に他の生物が有している機能を付加するために、当該機能を有する蛋白質をコードする遺伝子を、高等植物に導入して形質転換された高等植物において、当該導入遺伝子が十分に発現するための方法を提供するものである。

本発明は、有用植物に他の種の遺伝子を導入して有用植物を形質転換する方法において、導入される他の遺伝子がコードする蛋白質が有する機能を実質的に変更することなく、当該他の遺伝子の塩基配列中に存在する形質転換される有用植物のmRNAのポリ(A)付加に関係する要素の領域を、mRNAのポリ(A)付加に関係しないような他の塩基配列に改変することを特徴とする有用植物を形質転換する方法、及び、それに用いる導入遺伝子に関する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CN	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CR	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CU	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CY	キプロス	JP	日本	NO	ノールウェー	ZA	南アフリカ共和国
CZ	チェコ	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
DE	ドイツ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DK	デンマーク	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
		KR	韓国	RO	ルーマニア		

## 明 細 書

## 植物を形質転換する方法及びその植物並びにその遺伝子

技術分野

本発明は、有用植物に他の生物の遺伝子を導入して有用植物を形質転換する方法に関し、より詳細には導入される他の生物の遺伝子がコードする蛋白質が有する機能を実質的に変更することなく、当該他の生物の遺伝子の塩基配列中に存在する形質転換される有用植物の mRNA のポリ (A) 付加に関係する要素の領域を、mRNA のポリ (A) 付加に関係しないような他の塩基配列に改変することを特徴とする有用植物を形質転換する方法、それにより製造され得る形質転換された有用植物、それに使用される塩基配列が改変された核酸、及び、当該核酸の製造方法に関する。

背景技術

生物が生育するためには、多くの栄養素が必要である。植物はこれらの生育に必要な栄養素の大半を根から吸収している。栄養素を吸収するのに必要な各種の酵素活性が遺伝的に低いために、土壤中にある栄養素を吸収することができない植物がある。

例えば、鉄はほとんどの生物にとって必要不可欠な元素であり、光合成や呼吸など細胞を機能させるのに関わる多くの酵素に必要である。土壤中の可溶化した鉄としては、主に Fe (III) キレート (場合によっては Fe (II) キレート) として存在している。一般に植物は、Fe (III) に比べて Fe (II) が優先的に吸収されるが、これは植物の種類による。

植物には二種類の鉄の獲得機構、吸収機構 (I) (第 1 図参照) と吸収機構 (II) (第 2 図参照) とがある (Mori, 1994)。

第 1 図に示される吸収機構 (I) は、(1) 根圏へのプロトンの放出 (Olsen and Brown 1980)、(2) 根の細胞膜における三価鉄還元活性の増加 (Brown et al.

1961, Chaney et al. 1972)、(3)還元・キレート性物質の根からの分泌(Heather et al. 1984)、などからなっている。つまり放出したキレート物質によりFe(III)をキレート化し、根のフリースペース中のFe(III)-キレートを細胞膜上で三価鉄還元酵素によってFe(II)に還元し、Fe(II)トランスポーターを通して吸収するという仕組みである。根圏へプロトンを放出し、フリースペースのpHを下げることで還元酵素の活性を増加させているとも考えられている。しかし、三価鉄の還元活性は高pHで阻害されるため、高濃度の炭酸陰イオンによる強いpH緩衝作用により石灰クロロシスを起こす(Marschner et al. 1986)という問題が知られている。

また、第2図に示される吸収機構(II)は、イネ科植物に特有のもので、(1)ムギネ酸類(phytosiderophore)の合成、(2)根圏へのムギネ酸類の放出、(3)鉄とムギネ酸類との可溶性複合体の形成、(4)植物体によるムギネ酸類-鉄複合体の吸収、とからなっている(Takagi 1976, Takagi et al. 1984)。イネ科植物などにみられるこのような吸収機構(II)による鉄獲得機構は、高pHに阻害されないという長所がある。

一方、真核生物のモデルとして知られる酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)は前記した吸収機構(I)に類似した鉄吸収を行う。高等植物における遺伝子レベルでの研究はFe(II)のトランスポーターが酵母の鉄吸収変異株のコンプリメンテーションによってクローニングされている(Eide et al., 1996)が、まだ細かい鉄吸収のシステムについては調べられていない。

それに対して酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)ではその機構が非常に詳しく調べられている。酵母における鉄吸収は、まず細胞膜表面で三価鉄還元酵素FRE1、FRE2により三価鉄の二価鉄への還元を行う(Dancis et al., 1990, 1992, Georgatsou and Alexandraki, 1994)。還元された二価鉄を細胞内に取り込む手段として高親和性機構(high affinity)と、低親和性機構(low affinity)の2つの吸収機構がある。

高親和性機構による鉄吸収は、マルチ銅酸化酵素(multicopper oxidase)FET3による二価鉄の再酸化(Askwith et al. 1994)を行った後、恐らくは三価鉄のトランスポーターFTR1(Stearman et al., 1996)で細胞内に取り込まれると

考えられている。ここでF E T 3による二価鉄の再酸化には、銅が必要であることが分かっており(Dancis et al., 1994, Klomp et al., 1997)、F E T 3に銅を供給する経路についても調べられている(Yuan et al., 1995, Lin et al., 1997)。

一方、低親和性機構による鉄吸収は、二価鉄のトランスポーターであるF E T 4(Dix et al., 1994, 1997)の働きによるものであると考えられている。

酵母におけるこのような鉄吸収機構を植物に応用することにより、鉄欠乏土壌でも生育できる植物を創製することが可能となる。

本発明者らは、この目的で、Dr. Dancis (NIH) より提供を受けた酵母のF R E 1遺伝子を、タバコへ導入した形質転換されたタバコを創製した(山口, 1995)。

しかし、F R E 1遺伝子の導入された形質転換タバコでは、その還元活性は野生型に比べ変化がみられなかった。ノーザンハイブリダイゼーションの結果、酵母の遺伝子F R E 1はタバコではその転写産物が0.9 kbと小さなものになっていた。

このような異種生物の遺伝子を高等植物に導入しようとして転写が不完全だった例として、バチルス菌(*Bacillus thuringiensis*)のデルターエンドトキシン( $\delta$ -endotoxin(殺虫性のタンパク質))をコードする遺伝子群C r yがある。42以上のC r y遺伝子が存在し、大別すると4つのクラス(cry I~cry IV)に分けられる(Whiteley and Schnepf, 1986)。この殺虫性タンパク質をコードする遺伝子が高等植物に導入されたが、うまく発現しなかったり、極端に発現量が落ちていたことがわかった。

この原因として、(1)コドン利用率(codon usage)の違い、(2)C r y遺伝子のA T含量が高い、(3)m R N Aの不安定性、(4)C r y遺伝子の一部がイントロンとしてスプライシングされている、等があげられている。

C r y遺伝子群を高等植物で効率的に発現させるために、植物に合う塩基配列にそれぞれC r y遺伝子を直し、プライマーを合成してP C Rにより完全合成することでタンパクの発現量の高い形質転換植物を作製したことも報告されている(Perlak et al., 1991, Fujimoto et al., 1993, Nayak et al., 1997)。

このように、高等植物に他の生物の遺伝子などを導入して形質転換することは

知られているが、その発現は必ずしも十分なものではなかった。その原因として前記したような種々のものが考えられていた。

本発明者らは、有用な高等植物に他の生物が有している機能を付加するために、当該機能を有する蛋白質をコードする遺伝子を、高等植物に導入して形質転換された高等植物において、当該導入遺伝子が十分に発現するための要因を鋭意研究してきたところ、形質転換される植物のmRNAのポリ(A)付加に関する要素の塩基配列が発現に重要な部分であることを見出した。

したがって、本発明は、導入された遺伝子が形質転換された高等植物中で高効率で発現するための方法、当該形質転換された高等植物、及び、そのための遺伝子の改変方法を提供するものである。

#### 発明の開示

本発明は、有用植物に他の遺伝子を導入して有用植物を形質転換する方法において、導入される他の遺伝子がコードする蛋白質が有する機能を実質的に変更することなく、当該他の遺伝子の塩基配列中に存在する形質転換される有用植物のmRNAのポリ(A)付加に関する要素の領域を、mRNAのポリ(A)付加に関係しないような他の塩基配列に改変することを特徴とする有用植物を形質転換する方法に関する。前記したmRNAのポリ(A)付加に関する要素の領域の塩基配列としては、AATAAA様の塩基配列が好ましく、また、当該mRNAのポリ(A)付加に関する要素の領域が、GT-リッチな塩基配列の下流側に存在している領域であることが好ましい。さらに、当該領域の塩基配列の改変は、形質転換される有用植物のコドン利用率に基づいて行われることが好ましい。

本発明の方法においては、導入される遺伝子の塩基のG及びTが豊富な領域が少ないこと、導入される遺伝子の全領域にわたって塩基のG及びCの含有量の差が少ないこと、ATTTA配列を有さないこと、及び／又は、導入される遺伝子の開始コドンの上流に、コザック配列(Kozak配列)を有することが好ましい。

また、本発明は、本発明の方法により製造され得る形質転換された有用植物に関する。本発明の形質転換された有用植物は、生体であっても、種子であっても

よくその形態については制限はない。

さらに、本発明は、前記の形質転換する方法で使用され得る塩基配列が改変された塩基配列を有する核酸、特にDNAに関する。

本発明の核酸の塩基配列は、形質転換された有用植物において高効率で発現できるように改変されたものであり、例えば、当該有用植物のmRNAのポリ

(A) 付加に関する要素であり、当該ポリ(A) 付加に関する要素の部分を他の塩基配列で置換されていることを特徴とするものであり、さらには、導入される遺伝子の塩基のG及びTが豊富な領域が少ないこと、導入される遺伝子の全領域にわたって塩基のG及びCの含有量の差が少ないこと、A T T T A配列を有さないこと、及び／又は、導入される遺伝子の開始コドンの上流に、コザック配列(Kozak配列)を有することが好ましい。

また、本発明は前記した核酸類を、数個のフラグメントに分割して、これらのフラグメントを結合させることを特徴とする前記の核酸類を製造する方法に関する。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、植物の鉄分の吸収機構(I)を示すものである。

第2図は、植物の鉄分の吸収機構(II)を示すものである。

第3図は、高等植物におけるポリ(A) 付加の位置を示すものである。

第4図は、酵母の遺伝子FRE1のG及びTがリッチな配列を示すものである。

第5図は、refre1の合成法の概念を示すものである。

第6図は、refre1の合成に使用した30本のプライマーの配列を示すものである。

第7図は、refre1の配列と設定したプライマーとの関係を示すものである。

第8図は、refre1の全長の作成方法を示すものである。

第9図は、設計したrefre1の全配列を示すものである。

第10図は、FRE1(上段)とrefre1のG及びTの含有量を連続する8塩基単位で計算してグラフ化したものである。

第 1 1 図は、バイナリーベクター p R F 1 の構造を示すものである。

第 1 2 図は、本発明の形質転換された植物の生育を示す写真である。

第 1 3 図は、本発明の形質転換された植物の開花状況を示す写真である。

第 1 4 図は、r e f r e 1 をプローブとした形質転換体のサザンハイブリダイゼーションの結果を示すものである。左側はE c o R I とH i n d I I I の両者による消化の場合であり、右側はH i n d I I I での消化によるものである。N o . 1 ~ N o . 1 2 は形質転換体であり、W . T . は野生型である。

第 1 5 図は、r e f r e 1 をプローブとした形質転換体のノーザンハイブリダイゼーションの結果を示すものである。N o . 1 及びN o . 2 は形質転換体を示し、W . T . は野生型である。

第 1 6 図は、根における三価鉄還元酵素の活性を、F e (II) によるB P D S - F e (II) 複合体の赤い発色を示す写真である。左側は野生型であり、赤い発色はみられないが、右側の形質転換体の根では赤い発色が確認できる。

第 1 7 図は、別の形質転換体を用いて第 1 6 図と同じ実験を繰り返した場合の写真であり、形質転換体（右側）に赤い発色が確認できる。

第 1 8 図は、形質転換体の種から得られた 2 世代目を用いた根における三価鉄還元酵素の活性を、B P D S - F e (II) 複合体の赤い発色により示した写真である。形質転換体の 2 世代目（左側）にもB P D S - F e (II) 複合体による赤い発色が確認できた。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明の形質転換される有用植物としては、食品、医薬品などの産業上利用される植物であれば制限はないが、穀物、野菜、果実種、タバコなどの高等植物が好ましい。

また、本発明の導入される他の遺伝子としては、植物に対して有用なものであり、植物自体及びヒトに対して害を及ぼさないものであれば、特に制限はない。植物に対して直接的に有益なものであってもよいが、除草剤などの薬物に対する耐性を持たせるための遺伝子などであってもよいが、細菌、酵母などの生物由来の酵素などが好ましい。例えば、鉄の吸収に関与する酵母の三価鉄還元酵素 F R



E 1などが好ましい。

本発明者らは、形質転換された植物において、導入された遺伝子の発現を左右する要因として、mRNAのポリ（A）の付加を決定づけている塩基配列があることを見出した。さらに、このポリ（A）の付加を決定づけている塩基配列の上流にG Tーリッチな塩基配列が必要であることを見出した。つまり、G Tーリッチな塩基配列があると、植物ではポリ（A）の付加が決定され、その後でてくるポリ（A）シグナル、例えば、A A T A A A様の塩基配列の10～30 b後ろの箇所でmRNAを切断し、ポリ（A）ポリメラーゼの働きでポリ（A）が付加するのである。したがって、導入される遺伝子がこのような塩基配列を有している場合には、形質転換された植物においては、全長のmRNAは発現することができず、A A T A A A様の塩基配列を有するポリ（A）シグナルの10～30 b後ろでmRNAが切断されることになる。

したがって、本発明は導入される遺伝子中に存在する植物におけるポリ（A）シグナル、例えば、A A T A A A様の塩基配列、好ましくはG Tーリッチな塩基配列を他の塩基配列に改変することを特徴とするものである。

改変のための塩基配列の設計方法としては、まず、導入される遺伝子がコードしているアミノ酸配列を変更しないようにコドンを選定する。アミノ酸配列は、その蛋白質が有する機能に実質的な影響を及ぼさないのであれば、これを変更することもできるが、アミノ酸配列は変更しないようにおこなうのが好ましい。

アミノ酸をコードするコドンが複数存在する場合には、形質転換される植物のコドンの利用率を考慮して、当該植物の利用率が高いコドンを選定することが好ましい。

また、ポリ（A）シグナルの塩基配列の改変のみならず、G Tーリッチな塩基配列を除くことも好ましい。特に、高度にG Tーリッチな塩基配列が存在している場合には、その下流側に出現するポリ（A）シグナル様の塩基配列の領域でmRNAが切断される可能性が高いため、このような領域のG T含有量を減少させる改変が重要である。

さらに、本発明の方法によれば、前記の改変に加えて導入される遺伝子の全領域にわたって塩基のG及びCの含有量の差が少なくなるように改変するのが好ま

しい。また、mRNAの不安定化配列として知られている、A T T T A配列を有さないこと、及び／又は、導入される遺伝子の開始コドンの上流に、真核生物でmRNAが効率よく翻訳されるための配列として知られているコザック配列（Kozak配列）を有することが好ましい。

即ち、本発明の方法は、前記した塩基配列の改変に、さらに通常の改変方法を組み合わせて塩基配列を改変することも包含するものである。

塩基配列を代える方法としては、とくに制限はなく公知の各種の方法で行うことができる。例えば、ポイントミューテーションや制限酵素により切断して改変することなどの任意の方法で行うことができる。

また、改変すべき塩基が多数になる場合や、導入する遺伝子自体が短い場合には、合成法により製造することもできる。後により具体的に説明するように、遺伝子が長い場合であっても、これらをいくつかのフラグメントに分割して、PCR法により製造された各フラグメントを、制限酵素を用いて結合させることにより、改変された塩基配列を有する遺伝子を製造することもできる。

さらに、本発明の方法をより具体的に説明するが、本発明の方法が以下の説明で使用されるものに限定されるものでなく、以下の説明に基づいて広範囲な応用ができることは当業者には明らかである。

本発明者らは、まず、タバコに導入した酵母のFRE1のmRNAの長さが短くなっている（約0.9 kb）ことから、この原因を考察した。酵母の3価鉄還元酵素遺伝子FRE1をタバコに導入した場合の転写産物が不完全な長さであった原因として、

（1）mRNAの一部がイントロンとして切り出されている。

（2）翻訳領域（coding region）の途中で転写が終わっている。

という2つの可能性が考えられた。さらなる解析を行うためRT-PCRを行い、FRE1を遺伝子導入した形質転換タバコでは翻訳領域（coding region）の途中でポリ（A）の付加が起こっていることが判明した。

実際にいままで酵母の遺伝子を高等植物に導入し発現が確認されている例としてインベルターゼ（Hincha, 1996）などがある。今回、FRE1遺伝子の導入に

より同じ真核生物の遺伝子であっても完全長のmRNAが合成されない場合があるという新規な知見を得ることができた。

FRE1を導入した形質転換タバコで完全長のmRNAができない理由は、FRE1の翻訳領域(coding region)の途中でポリ(A)が付加しているためであった。

ポリ(A)が付加する位置(poly(A) site)は一ヶ所ではなく、それぞれのポリ(A)サイトの上流には確かに塩基配列がAAUAAA様のポリ(A)シグナルと推定される領域(putative poly(A) signal)が存在した。しかし、AAUAAA様の配列というのは、FRE1の5'側にいくつか存在するが、これらの場所ではポリ(A)の付加は起こっていないことがわかった。

植物においてポリ(A)の付加を決定づけているのは、ポリ(A)シグナルのさらに上流に存在する、GUーリッチな配列の方ではないかと考えられた。つまりGUーリッチな配列があると植物ではポリ(A)の付加が決定され、その後でくるAAUAAA様の配列の10～30b後ろの「PyA」でmRNAを切断し、ポリ(A)ポリメラーゼの働きでポリ(A)が付加するのだろう。

結局、酵母ではポリ(A)の付加に無関係であったGUーリッチな配列が植物では、ポリ(A)の付加を決定していることが、FRE1を導入した形質転換タバコで完全長のmRNAができない原因であると考えられた。

三価鉄還元酵素FRE1のGTーリッチであると思われる配列を第4図に示す。第4図の四角で囲った領域がGTーリッチであると考えられる領域である。

従って、タバコで三価鉄還元酵素FRE1を発現させるためには、FRE1遺伝子のGTーリッチな配列を除けばいいと考えられる。しかし、現在までのところ植物のポリ(A)付加を決定づける配列についてはコンセンサスがGUーリッチというぐらいで、配列がはっきりと特定されているわけではない。はっきりとしたコンセンサスがわからない以上、その配列を変えるだけでは完全長のmRNAを得られない可能性がある。植物において完全長のmRNAが合成されるように、FRE1のアミノ酸配列を変えずに、形質転換される植物のコドン利用率(codon usage)にあわせた塩基配列を設計することにした。

そこで、本発明者らは、タバコで酵母の三価鉄還元酵素を発現させるために、

F R E 1 のアミノ酸配列を変えずにタバコのコドン利用率 (codon usage) にあった塩基配列に設計し直した。塩基配列の設計に当たって次ぎの点を考慮した。

- (1) G T - リッチな領域除いた。
- (2) ポリ (A) シグナルとされる塩基配列 A A T A A A およびそれに似た塩基配列を除いた。
- (3) 塩基配列を確認しやすいように、約 4 0 0 b p ごとに制限酵素部位をつくり、5 つのセグメントに分けた (4 1 7 ~ 4 3 6 b p) 。
- (4) m R N A の不安定化配列といわれる塩基配列 A T T T A 配列 (Ohme-Takagi, 1993) をなくした。
- (5) 全領域にわたって塩基 G 及び C の含量に差がないようにコドンの位置を入れ換えた。
- (6) K o z a k 配列と呼ばれる真核生物で、m R N A が効率よく翻訳されるための配列 (Kozak, 1989) を開始コドンの前に付けた。

このようにして設計された酵母の三価鉄還元酵素 F R E 1 の遺伝子の改変された塩基配列を、配列表の配列番号 1 に示す。また、配列番号 2 にそのアミノ酸配列を示す。

設計された遺伝子の名前は、再構築 F R E 1 (以下、reconstructed F R E 1 の略で「r e f r e 1」という。) とした。

本発明の r e f r e 1 は、第 5 図に示す 5 個のセグメント (A ~ E) に分けて合成された。

セグメント A は、4 3 4 b p までのもので、1 塩基目から E c o R I、7 塩基目から X b a I、4 2 9 塩基目から B a m H I の制限酵素サイトを持つように設計された。セグメント B は、4 2 9 ~ 8 4 5 b p までのもので、4 2 9 塩基目から B a m H I、8 4 0 塩基目から M r o I の制限酵素サイトを持つように設計された。セグメント C は、8 4 0 ~ 1 2 7 5 b p までのもので、8 4 0 塩基目から M r o I、1 2 7 0 塩基目から S a l I の制限酵素サイトを持つように設計された。セグメント D は、1 2 7 0 ~ 1 6 9 6 b p までのもので、1 2 7 0 塩基目から S a l I、1 6 9 1 塩基目から P s t I の制限酵素サイトを持つように設計された。セグメント E は、1 6 9 1 ~ 2 0 9 2 b p までのもので、1 6 9 1 塩基目

から P s t I、2081塩基目から S a c I、2087塩基目から H i n d I I I の制限酵素サイトを持つように設計された。

417～436bpの各セグメントA～Eは、それぞれ77～83merのプライマー6本を用いて合成した。使用したA-1～E-6までの30本のプライマーを第6図に示す。また、これらの塩基配列を配列表の配列番号5～34に示す。

各セグメントのプライマーのうちの-1、-2、-3はセンス鎖であり、プライマー-4、-5、-6はアンチセンス鎖である。各セグメントのプライマー-3と-4が、3'末端に12か13bpの相補鎖、プライマー-1と-2、-2と-3、-4と-5、-5と-6がそれぞれ3'末端に12か13bpのオーバーラップをもつようにプライマーを設定した。また、プライマー-1と-6は5'末端の1塩基目から制限酵素部位をもつように設定した。

これらのプライマーと、設計された塩基配列との関係を第7図に示す。

各セグメントA～Eは、前記した塩基配列に従って合成されたプライマーを用いてPCR法により（第5図参照）製造された。

3段階目のPCRの反応液を0.8%アガロースゲルで電気泳動した後、予想される長さ（417～436bp）のバンドを切り出して精製し、プラスミドpT7Blue（R）ベクター（TaKaRa製）へクローニングした。得られたクローンの塩基配列を確認し、蛍光DNAsequencerDSQ-1000L（島津製）を利用して正しい塩基配列をもつものを選抜した。

それぞれの正しい配列をもつセグメントを得た後、制限酵素部位を利用して第8図に示す方法によりrefre1の全長を作成した。

セグメントB及びEは、インサートの向きが全長の作成ために必要であった。他のセグメントについてはインサートの向きに関係なく正しい塩基配列を含んでいるものを使用した。

得られたrefre1の全塩基配列を第9図示す。refre1の配列の特徴としては、

(1) 元のFRE1と75.3%のホモロジーがある。

(アミノ酸配列は100%)

- (2) 8塩基以上連続したG又はTのみの配列を含まない。
- (3) A A T A A Aという配列だけでなく、この中のどの1塩基を他の塩基で置換した配列も含まない。
- (4) A T T T A 配列を含まない。
- (5) 全領域にわたってG C含量に差がない。

等があげられる。

元のF R E 1と比べて、r e f r e 1では連続したG及びTのみの配列が減っていることを第10図に示す。これは、F R E 1およびr e f r e 1の配列中の連続した8塩基のG T含量を%で表したものである。第10図に示したように、r e f r e 1では、G Tの含有量が元のF R E 1に比べて均一化されていることがわかる。

このようにして合成した遺伝子r e f r e 1をタバコ(Nicotiana Tabacum L. var. SR1)へ導入した。形質転換の結果カナマイシンに耐性な植物が68個体再生した。再生してきた植物に目的遺伝子であるr e f r e 1が導入されていることと、そのコピー数を確認するためにゲノミック・サザン・ハイブリダイゼーションを行った。その結果形質転換体で1から数コピーの個体においてr e f r e 1遺伝子の存在が確認された。

植物細胞への遺伝子導入から植物体を再生させるまでの方法は、通常の方法により行うことができる。例えば、「ラボマニュアル植物遺伝子の機能解析」(丸善)(参考文献(4))に記載の方法に準じて行うことができる。

より具体的には、前記の方法でp T 7 B l u e (R)ベクターにクローニングしたr e f r e 1の制限酵素X b a lとS a c Iとのフラグメントを、バイナリーベクター p B l 1 2 1 (T O Y O B O製)の $\beta$ -g l u c r o n i d a s e の O R Fと定法により交換し、バイナリーベクターp R F 1を作成した。バイナリーベクターp R F 1の構造を第11図に示す。

得られたバイナリーベクターp R F 1を大腸菌に入れ、この大腸菌とヘルパープラスミドp R K 2 0 1 3(helper plasmid pRK2013)をもつ大腸菌とを、37℃で1晩振盪培養した。一方、アグロバクテリウムツメファシエンスC 5 8 (Agrobacterium tumefaciens C58)を、適切な抗生物質を含むL B液体培地1 m L中

で 26℃で2晩振盪培養した。これらを、それぞれ100  $\mu$ L をとり抗生物質を含まないLBプレート上に混合し、26℃で2晩培養した後、白金スパチュラでプレートをかきとり選択プレート (100  $\mu$ g/ $\mu$ L rifampicin (Rf) と25  $\mu$ g/ $\mu$ L kanamycin (Km) を含むLBプレート) にて、26℃で2晩培養してシングルコロニーを形成させた。

シングルコロニーを4 mLのLB (Km, Rf) 液体培地中、26℃で2晩振盪培養し、アルカリ-SDS法 (alkaline-SDS法) で、プラスミドを抽出し制限酵素による切断パターンをみることで、pRF1の存在を確認した。

形質転換される植物は次のようにして用意された。

野生型のタバコの8 cmほどの若い葉を2～3枚切り取り、滅菌液 (次亜塩素酸10%、Tween 20 0.1%) で満たしたシャーレに入れ、15分間攪拌しながら滅菌した。その後、滅菌水で3回ゆすいだ後、葉を8 mm 角にメスで切った。シャーレに集めておいた葉片に、LB (Km, Rf) 液体培地中、26℃で2晩培養したバイナリーベクターpRF1をもつアグロバクテリウムツメファシエンスC58 (*Agrobacterium tumefaciens* C58) の培養液を3 mLを加えた。1分後パスツールピペットですばやく液を取り除き、さらにオートクレーブ滅菌した濾紙上で余分な液を取り除いた。

葉片を、MS培地にベンジルアデニン及びナフタレン酢酸を加えた培地上に置き、25℃で明るい条件で3日間培養した。その後、葉片を前記のMS培地にさらにクラフォラン (CLAFORAN) を加えた培地に移し1週間培養した後、前記のクラフォランを加えた培地にさらにカナマイシンを加えたMS培地に移し、2週間ごとに植え継いだ。カルスが誘導され、シュート (shoot) が形成されたらメスで当該シュート (shoot) を切り取り、MS培地にカナマイシンを加えた培地に移した。

シュート (shoot) から根が出たものをバーミキュライトに植えかえ、ハイボネックス (ハイボネックス ジャパン) を与えて育て形質転換された植物を得た。

形質転換の結果、カナマイシンに耐性をもつ形質転換された植物を68個体得

ることができた。これらの植物のうちの生育した例を第12図、及び、開花しているものを第13図に写真として示す。

そのうちの5個体についてゲノミックサザン・ハイブリダイゼーションを行った。その結果を第14図に示す。

ゲノミックサザン・ハイブリダイゼーションは、形質転換されたタバコからのゲノムDNAの抽出は「植物細胞工学シリーズ2 植物のPCR実験プロトコル」(秀潤社)(参考文献(2))に従って行い、得られたゲノムDNAを、制限酵素EcoRI及びHindIIIをもちいて消化し、refre1の全長断片を鋳型として作成したプローブ(ただし $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ を用いた)を用いて行った。

第14図に示されゲノミックサザン・ハイブリダイゼーションでは制限酵素処理の時点でDNA量を揃えたが、制限酵素処理後エタノール沈殿を行ったために泳動量にばらつきがみられる。従ってここで検出されたバンドの濃さは必ずしも導入された遺伝子のコピー数を反映しているわけではない。

制限酵素EcoRI及びHindIIIを用いた消化ではすべての個体で予想される、3.2kbpの大きさにバンドが観察された。しかし、No.12の個体からは3.2kbpよりもわずかに小さいバンドも検出された。この結果によれば、No.1とNo.11には1コピー、No.2には3コピーか4コピー、No.9には4コピーの、refre1が存在していると考えられる。

なお、No.12のHindIIIによる消化はゲルへのロードミスのためバンドが検出されなかった。

前記のゲノミックサザン・ハイブリダイゼーション解析の結果から、ここで選んだ5個体については、refre1遺伝子が導入されていることがわかった。

制限酵素EcoRI及びHindIIIで切り出すと、プロモーターからターミネータまでが切り出されるので、導入したrefre1遺伝子はCaMV35Sプロモーターの制御下でmRNAへと転写されることになる。No.12のEcoRI及びHindIIIの両者での消化において、3.2kbpよりもわずかに小さいバンドも検出されたのは、おそらく導入されたコンストラクトのうちの 하나가植物ゲノムに組み込まれる前に途中で切れてしまい、植物ゲノムのEc



o R I か H i n d I I I 部位の近くに入ったのだろうと考えられる。

次に、前記のゲノミックサザン・ハイブリダイゼーションで *ref re 1* 遺伝子の導入が確認された形質転換されたタバコの No. 1 と No. 2 について、全長の m R N A ができていることをノーザン解析により確認した。

この解析における、プロットイングの方法は定法、例えば、「クローニングとシークエンス」（農村文化社）（参考文献（1））に従って行い、ハイブリダイゼーションの方法は前記のサザン解析の場合と同様に行った。

ノーザンハイブリダイゼーションの結果を第 15 図に示す。第 15 図では、野生型（W. T.）のレーンにはバンドは検出されなかった。No. 1 と No. 2 のレーンには、2. 5 k b の大きさにメジャーなバンドが検出され、それより小さな位置にいくつかのバンドが検出された。

ノーザン解析により、本発明の *ref re 1* の導入により完全長の m R N A ができたかどうかを確認することができた。この解析は、本来は最も発現していて欲しい根からの全 R N A を抽出すべきことになるのではあるが、この試験では根を切断してしまうと次世代の植物を得ることができなくなってしまうので、葉からの抽出によって行った。プロモーターに C a M V 3 5 S を用いたことから植物体全体で *ref re 1* 遺伝子が発現していることから、葉からの全 R N A を抽出した前記の解析によっても、植物体の中なら葉でも根でも同じ様に転写が行われ、p o l y (A) の付加位置も変わらないことも確認できた。

ノーザンハイブリダイゼーションの結果から、*ref re 1* を導入したタバコでは 2. 5 k b の転写産物が確認されたので、p o l y (A) の付加は、N O S のターミネーターによって起こっていると考えられる。*ref re 1* を導入したタバコでは完全長の m R N A ができていることがわかった。

第 15 図にみられる、2. 5 k b よりも小さなバンドは、泳動後に撮影した写真と比較するとちょうど r R N A の位置に検出されていた。r R N A へのプローブの非特異的な吸着かとも考えられたが、野生型の R N A にはハイブリダイズしていないことから、*ref re 1* の転写産物にハイブリダイズしていることは間違いない。*ref re 1* でも全長よりも短い m R N A がわずかながらできているという可能性はある。しかし完全に r R N A と同じ大きさに検出されたことから

考えると、RNAの泳動時に、refrelのmRNAが大量に存在するrRNAに引きずられたのではないかと考えられる。poly(A)+RNAだけを精製してノーザンハイブリダイゼーションを行うことで、この理由は明らかにすることができるが、第15図からも明なように大部分が完全長のmRNAであったのでその理由を追求する必要はなかった。

また、このノーザンハイブリダイゼーションのために、サザンハイブリダイゼーションの結果、1コピーであったNo. 1の形質転換体と、3又は4コピーであったNo. 2の形質転換体のRNAを泳動したが、refrel遺伝子のコピー数に従って、No. 2の方がバンドが明らかに濃いことがわかった。

さらに、得られた形質転換されたタバコ（カナマイシンで選抜）68個体のうち、6個体について根における恒常的な三価鉄還元活性を確認した。

還元活性の確認には、Fe(II)の強力なキレーターである、バソフェナンソロリンジスルホン酸(bathophenanthroline disulfonic acid(BPDS))がFe(II)と複合体を形成することで赤色を呈することを利用した。形質転換体と野生型のタバコのパーミキュライトを除いた後、根をBPDSを含有するゲルに寝かせアルミホイルで遮光して27℃で24時間静置した。形質転換体の根圏での発色から三価鉄の還元が確認された。

還元酵素活性の確認の写真を第16図及び第17図に写真で示す。第16図及び17の写真には、写真右側の形質転換体のほうが赤色に発色していることが黒く示されている。

このように、根での三価鉄還元酵素活性の確認に用いた6個体(kanamycin選抜)はすべて三価鉄還元活性が検出された。形質転換されたタバコと野生型のタバコでの差を明確にするために還元酵素による反応時間を24時間と長く設定したが、1時間ぐらいからその違いは確認された。実験に用いた形質転換体6個体すべてについて言えることだが、活性試験用のゲルにおくと野生型に比べて葉が萎れてしまうという傾向があった。これは、導入したrefrel遺伝子の葉での発現が、何らかのメカニズムで関与しているのではないかと推測される。このためあまり活性試験は行わなかったが、CaMV35Sプロモーターの制御の下でrefrel遺伝子が根においても転写・翻訳され発現していることはまちがい

ない。

このように、本発明者らは、酵母の三価鉄還元酵素 F R E 1 を高等植物であるタバコで発現することができる新規なタバコを創製した。

異種生物の遺伝子の転写産物が完全長でないということが起こる原因として、m R N A の一部がイントロンとしてスプライシングされている可能性と、翻訳領域 (coding region) の途中でポリ (A) が付加しているという 2 つの可能性が考えられる。

本発明は、異種生物の遺伝子を高等植物に導入して、完全長の転写産物が得られるための塩基配列の設計方法を提供するものである。本発明の方法は、翻訳領域 (coding region) の途中で、ポリ (A) の付加を避けるために、8 塩基以上連続した G 又は T のみの配列を含まず、A A T A A A という配列だけでなく、この中のどの 1 塩基を他の塩基で置換した配列 (即ち、N A T A A A、A N T A A A、A A N A A A、A A T N A A、A A T A N A、又は、A A T A A N) も含まないように設計する必要があることが判明した。

また、G 及び C の含量が全領域にわたって一定になるように設計することも重要であることがわかった。

さらに、前記の発明の具体的な説明においては、プロモーターとして C a M V 3 5 S を用いたので形質転換されたタバコでは、植物体全体で三価鉄還元酵素が発現した。このように、プロモーターとの組合せにより、局所的に発現している遺伝子を植物全体で発現させることもできるようになる。また、反対に植物全体で発現している遺伝子を局所的に発現させることも、適当なプロモーターとの組合せにおいて可能となる。

また、三価鉄を還元して吸収する機構はイネ科を除く単子葉と双子葉植物の鉄獲得機構に特徴的だが、イネ科でも鉄が十分に存在する状態では三価鉄を二価鉄に還元して吸収しているのではないかと考えられている。鉄欠乏の根で特異的に働くプロモーターに、本発明の三価鉄還元酵素遺伝子 r e f r e 1 をつなぐことにより、鉄欠乏条件下で鉄の吸収機構 (I) と吸収機構 (II) とを機能させることのできる新規なイネ科植物の創製も考えられる。

以下に、本発明の参考文献を掲載する。

- (1) クローニングとシーケンス (1989) 農村文化社
- (2) 植物のPCR実験プロトコール (1995) 秀潤社
- (3) バイオ実験 イラストレイテッド・遺伝子解析の基礎 (1995) 秀潤社
- (4) ラボマニュアル植物遺伝子の機能解析 (1992) 丸善
- (5) アスキウイズら、セル、76巻、403-410頁 (1994年)  
(Askwith, C., et al., Cell, 76:403-410 (1994))
- (6) ブラウンら、ソイルサイエンス、91巻、127-132頁 (1961)  
(Brown, J.C., et al., Soil Sci., 91: 127-132 (1961))
- (7) チャネイら、プラントフィジオロジー、50巻、208-213頁 (1972年)  
(Chaney, R.L., et al., Plant Physiol. 50: 208-213 (1972))
- (8) ダンシスら、モレキュラーセルバイオロジー、10巻、2294-2301頁 (1990年)  
(Dancis, A., et al., Mol. Cell. Biol. 10: 2294-2301 (1990))
- (9) ダンシスら、プロシーディングオブナショナルアカデミックサイエンス  
USA、89巻、3869-3873頁 (1992年) (Dancis, A.,  
et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 3869-3873 (1992))
- (10) ディックスら、ジャーナルオブバイオロジカルケミストリー、269巻、  
26092-26099頁 (1994年) (Dix, D.R., et al., J. Biol.  
Chem. 269: 26092-26099 (1994))
- (11) ディックスら、ジャーナルオブバイオロジカルケミストリー、272巻、  
11770-11777頁 (1997年) (Dix, D., et al., J. Biol.  
Chem. 272: 11770-11777 (1997))
- (12) エイデら、プロシーディングオブナショナルアカデミックサイエンス  
USA、93巻、5624-5628頁 (1996年) (Eide, D., et al.,  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 5624-5628 (1996))
- (13) フジモトラ、バイオテクノロジー、11巻、1151-1155頁  
(1993年) (Fujimoto, H., et al., Bio/Technology 11: 1151-1155  
(1993))

- (14) ガリーら、プラントセル、9巻、667-673頁(1997年)  
(Gallie, D.R., et al., Plant Cell 9: 667-673 (1997))
- (15) ジョーガトソら、モレキュラーセルバイオロジー、14巻、3065-3073頁(1994年)(Georgatsou, E. et al., Mol. Cell. Biol. 14: 3065-3073 (1994))
- (16) グオら、バイオケミカルサイエンス、21巻、477-481頁(1996年)(Guo, Z. et al., Biochem. Sci. 21: 477-481 (1996))
- (17) ハセットら、ジャーナルオブバイオロジカルケミストリー、270巻、128-134頁(1995年)(Hassett, R. et al., J. Biol. Chem. 270: 128-134 (1995))
- (18) ヘザーら、ジャーナルオブプラントニュートリション、7巻、667-676頁(1984年)(Hether, N.H., et al., J. Plant Nutr. 7: 667-676 (1984))
- (19) ハインから、ジャーナルオブプラントフィジオロジー、147巻、604-610頁(1996年)(Hinch, D.K., et al., J. Plant Physiol. 147: 604-610 (1996))
- (20) コザック、ジャーナルオブセルバイオロジー、108巻、229-241頁(1989年)(Kozak, M., J. Cell. Biol. 108: 229-241 (1989))
- (21) リンら、ジャーナルオブバイオロジカルケミストリー、272巻、9215-9220頁(1997年)(Lin, S.J., et al., J. Biol. Chem. 272: 9215-9220 (1997))
- (22) マーシェナーら、ジャーナルオブプラントニュートリション、9巻、695-713頁(1986年)(Marschner, H., et al., J. Plant Nutr. 9: 695-713 (1986))
- (23) メウエスら、ネイチャー、387巻、7-8頁(1997年)  
(Mewes, H.W., et al., Nature 387: 7-8 (1997))
- (24) モリら、「根圏における微量金属栄養素の生化学」、第225-249頁(1994年)(Mori, S. (1994) Biochemistry of metal micronutrients in the rizosphere. (Eds. Manthey, J.A., Crowley, D.E., Luster, D.

G., Lewis Publishers) pp. 225-249)

- (25) ナイトーら、プラントモレキュラーバイオロジー、11巻、109-124頁(1988年) (Naito, S., et al., Plant mol. Biol. 11:109-124 (1988))
- (26) ナカニシら、プラントセルフィジオロジー、34巻、401-410頁(1993年) (Nakanishi, H., et al., Plant Cell Physiol. 34: 401-410 (1993))
- (27) ナヤックら、プロシーディングオブナショナルアカデミックサイエンス USA、94巻、2111-2116頁(1997年) (Nayak, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 2111-2116 (1997))
- (28) オーメータカギら、プロシーディングオブナショナルアカデミックサイエンス USA、90巻、11811-11815頁(1993年) (Ohme-Takagi, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11811-11815 (1993))
- (29) オクムラら、ジャーナルオブプラントニュートリション、15巻、2157-2172頁(1992年) (Okumura, N., et al., J. Plant Nutr. 15: 2157-2172 (1992))
- (30) オクムラら、プラントモレキュラーバイオロジー、25巻、705-719頁(1994年) (Okumura, N., et al., Plant Mol. Biol. 25: 705-719 (1994))
- (31) オルセンら、ジャーナルオブプラントニュートリション、2巻、629-660頁(1980年) (Olsen, R.A. et al., J. Plant Nutr. 2: 629-660 (1980))
- (32) パーラックら、プロシーディングオブナショナルアカデミックサイエンス USA、88巻、3324-3328頁(1991年) (Perlak, F.J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 3324-3328 (1991))
- (33) スティアマンら、サイエンス、271巻、1552-1557頁(1996年) (Stearman, R., et al., Science 271: 1552-1557 (1996))
- (34) タカギ、ソイルサイエンスアンドプラントニュートリション、22巻、

- 4 2 3 - 4 3 3 頁 (1 9 7 6 年) (Takagi, S., Soil Sci. Plant Nutr. 22 : 423-43 3 (1976))
- (3 5) タカギら、ジャーナルオブプラントニュートリション、7 巻、6 2 9 - 6 6 0 頁 (1 9 8 4 年) (Takagi, S., et al., J. Plant Nutr. 7: 469-47 7 (1984))
- (3 6) ホワイトレーら、アヌアルレビューマイクロバイオロジー、4 0 巻、5 4 9 - 5 7 6 頁 (1 9 8 6 年) (Whiteley, H.R., et al., Annu. Rev. Microbiol. 40: 549-576 (1986))
- (3 7) ウーら、プラントジャーナル、8 巻、3 2 3 - 3 2 9 頁 (1 9 9 5 年) (Wu, L., et al., Plant J. 8:323-329 (1995))
- (3 8) ヤーンら、プロシーディングオブナショナルアカデミックサイエンス U S A、9 2 巻、2 6 3 2 - 2 6 3 6 頁 (1 9 9 5 年) (Yuan, D.S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 2632-2636 (1995))

### 実施例

つぎに実施例により、本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

以下の実施例においては、基本的な遺伝子操作は「クローニングとシークエンス」(農村文化社)に従い、遺伝子の塩基配列の解析には DNASIS (Hitachi製)を使用した。

#### 実施例 1 (FRE 1 を導入した形質転換タバコからの全 RNA の抽出)

FRE 1 を導入した形質転換タバコからの全 RNA の抽出は (Naito et al., 1988) に従って行った。

FRE 1 を導入した形質転換タバコの葉 2 g を乳鉢に入れ、液体窒素を加えて完全にすりつぶした。破碎物に 3 倍量の抽出用緩衝液と等量のフェノール/クロロホルム (1 : 1) を加え懸濁し、8 0 0 0 r p m で 1 5 分遠心した後、水層を別のチューブに移し、さらに 2 回フェノール/クロロホルム抽出をし、その後クロロホルム抽出を 1 回行った。 - 8 0 ° C で 3 0 分間エタノール沈殿し、8 0 0 0

r p m、4℃で30分遠心し沈殿を70%エタノールで洗浄後、減圧乾燥した。沈殿を1mLのDEPC水に溶かし、13500 r p mで3分遠心して上清を新しいチューブに移し、1/4 vol. の10M LiClを加えて氷上で2時間静置した。12000 r p m、4℃で10分遠心し、沈殿を70%エタノールで洗浄後、減圧乾燥したものをDEPC水50μLに溶かした。

#### 試薬 抽出用緩衝液

1 M Tris · HCl pH9.0

1% SDS

(使用前に6mLに対して120μLのβ-メルカプトエタノールを加える。)

#### 実施例2 (ポリ(A) + RNAの精製とcDNAの合成)

実施例1で得た総RNAの100μgから、ダイナビーズオリゴ(Dynabeads Oligo) (dT) 25 (DYNAL製)を利用して、ポリ(A) + RNAを精製した。このポリ(A) + RNAを下記のハイブリッドプライマーを用いて、37℃で1時間 M-MLVリバーシトランスクリプターゼ(M-MLV reverse transcriptase) (TOYOBO製)により逆転写反応を行いcDNAを得た。

ハイブリッドプライマー (dT<sub>17</sub>アダプタープライマー)

5' - G A C T C G A G T C G A C A T C G A T T T T T T T T T T T T T T T T T T T - 3'

#### 実施例3 (RT-PCRと塩基配列の確認)

実施例2で得られたcDNAを鋳型としてハイブリッドプライマーに特異的なプライマーと、FRE1の5'プライマーで、PCRを行った。

PCRの反応産物を0.8% アガロースで電気泳動し、得られたバンドをpT7Blue (R) ベクター (TaKaRa製) へクローニングした。コロニーをLB培地で1晩振盪培養し、アルカリ-SDS法でプラスミドを抽出し、制限酵素処理によりインサートが入っていることが確認された7つのクローンの塩基



配列をブカベストDNAポリメラーゼ (Bca BEST DNA polymerase) を用いて決定した。(「バイオ実験 イラストレイテッド・遺伝子解析の基礎」)(秀潤社)。

ハイブリッドプライマーに特異的なプライマー

5' - G A C T C G A G T C G A C A T C G - 3'

F R E 1 の 5' プライマー

5' - A C A C T T A T T A G C A C T T C A T G T A T T - 3'

#### P C R の反応条件

(1) 95℃ 5分

(2) 95℃ 40秒

(3) 55℃ 30秒

(4) 72℃ 1分

(5) 72℃ 10分

(6) 4℃

で、(2)、(3)、及び、(4)を40回繰り返した。

この結果、F R E 1を導入した形質転換タバコでは、F R E 1遺伝子から転写されたmRNAには、第3図に示すような位置でポリ(A)が付加していた。

ポリ(A)の付加位置は一様ではなく、いくつかの長さのmRNAが存在した。ポリ(A)サイト(poly(A) site)の上流のポリ(A)シグナル(poly(A) signal)として認識されていると思われる配列を推定されるポリ(A)シグナル(putative poly(A) signal)として示した。

#### 実施例4 (P C R法による各セグメントの製造)

各セグメントは、第5図に示される、P C R法により製造した。タックポリメラーゼ(Taq polymerase)はスーパータック(super Taq)(サワディー製)を使用した。

P C R反応液の組成は、次のとおりである。

#### 第1段階のP C R反応液

10x 緩衝液	10 $\mu$ L
2 mM dNTP 混合物	10 $\mu$ L
20 $\mu$ M プライマー (−3)	5 $\mu$ L
20 $\mu$ M プライマー (−4)	5 $\mu$ L
蒸留水 で 全量を	99.5 $\mu$ L

## 第2段階のPCR反応液

第1段階のPCR反応混合物	1 $\mu$ L
10x 緩衝液	10 $\mu$ L
2 mM dNTP 混合物	10 $\mu$ L
20 $\mu$ M プライマー (−2)	5 $\mu$ L
20 $\mu$ M プライマー (−5)	5 $\mu$ L
蒸留水 で 全量を	99.5 $\mu$ L

## 第3段階のPCR反応液

第2段階のPCR反応混合物	1 $\mu$ L
10x 緩衝液	10 $\mu$ L
2 mM dNTP 混合物	10 $\mu$ L
20 $\mu$ M プライマー (−1)	5 $\mu$ L
20 $\mu$ M プライマー (−6)	5 $\mu$ L
蒸留水 で 全量を	99.5 $\mu$ L

## PCRの反応条件

- (1) 95℃ 5分
- (2) タック 0.5  $\mu$  L 添加
- (3) 95℃ 40秒
- (4) 45℃ 1分
- (5) 72℃ 1分
- (6) 94℃ 40秒
- (7) 60℃ 30秒
- (8) 72℃ 1分

(9) 72℃ 10分

(10) 4℃

で、(3)、(4)、及び、(5)を5回、(6)、(7)、及び、(8)を20回繰り返した。

#### 実施例5 (クローニングと塩基配列の確認)

実施例4の第3段階目のPCRの反応液を、0.8%アガロースゲルで電気泳動した後、予想される長さ(417~436bp)のバンドを切り出して精製し、プラスミドpT7Blue(R)ベクター(TaKaRa製)へクローニングした。得られたクローンの塩基配列を確認し、SHIMADZU 蛍光DNA sequencer DSQ-1000Lを利用して正しい塩基配列をもつものを選抜した。

それぞれの正しい配列をもつセグメントを得た後、制限酵素部位を利用して第8図のようにrefre1の全長を作成した。セグメントB、Eは、インサートの向きが全長の作成ために必要であった。他のセグメントについてはインサートの向きに関係なく正しい塩基配列を含んでいるものを使用した。

合成したrefre1の全塩基配列を、配列表の配列番号1及び第9図に示す。

#### 実施例6 (refre1のタバコへの導入)

実施例5により合成した遺伝子refre1を、タバコ(Nicotiana Tabacum L. var. SR1)へ導入した。形質転換の結果、カナマイシンに耐性な植物が68個体再生した。再生してきた植物に目的遺伝子であるrefre1が導入されていることと、そのコピー数を確認するためにゲノミック・サザン・ハイブリダイゼーションを行った。その結果、1コピーから数コピーのrefre1遺伝子の存在が確認された。

植物細胞への遺伝子導入から植物体を再生させるまでの方法は、「ラボマニュアル植物遺伝子の機能解析」(丸善)に従って行われた。

#### (1) 形質転換用バイナリーベクターpRF1の作成

pT7Blue(R)ベクターにクローニングしたrefre1のXbaIと

SacIフラグメントを、TOYOBOから市販されているバイナリーベクターpBI121の $\beta$ -グルクロニダーゼ ( $\beta$ -glucuronidase) のORFと交換して、バイナリーベクターpRF1を作成した。バイナリーベクターpRF1の構造を第11図に示す。

(2) (バイナリーベクターpRF1のアグロバクテリウム (Agrobacterium) への導入)

適切な抗生物質を含むLB液体培地1mL中で、アグロバクテリウムツメファシエンスC58 (Agrobacterium tumefaciens C58) を26℃で2晩振盪培養、pRF1をもつ大腸菌とヘルパープラスミド (helper plasmid) pRK2013をもつ大腸菌を37℃で1晩振盪培養した後、それぞれ100 $\mu$ Lをとり抗生物質を含まないLBプレート上に混合した。26℃で2晩培養した後、白金耳でプレートをかきとり選択プレート (100 $\mu$ g/ $\mu$ Lリファンピシン (rifampicin) (Rf) と25 $\mu$ g/ $\mu$ Lカナマイシン (kanamycin) (Km) を含むLBプレート) に、シングルコロニーを形成させた (26℃で2晩培養)。

得られたシングルコロニーを4mLのLB (Km, Rf) 液体培地中、26℃で2晩振盪培養し、アルカリン-SDS法でプラスミドを抽出し、制限酵素による切断パターンをみることで、pRF1の存在を確認した。

(3) (アグロバクテリウム (Agrobacterium) のタバコへの感染と植物体の再生)

野生型の8cmほどタバコ (Nicotiana Tabacum L. var. SR1) の若い葉を2～3枚切り取り、滅菌液 (次亜塩素酸10%, Tween 20 0.1%) で満たしたシャーレに入れ、15分間攪拌しながら滅菌した。その後滅菌水で3回ゆすいだ後、葉を8mm角にメスで切った。シャーレに集めておいた葉片に、LB (Km, Rf) 液体培地中、26℃で二晩培養したバイナリーベクターpRF1をもつアグロバクテリウム (Agrobacterium) の培養液を3mLを加えた。

1分後、パスツールピペットですばやく液を取り除き、さらにオートクレーブ滅菌した濾紙上で余分な液を取り除いた。葉片を下記のMS培地 (II) 上に置き、

25℃で明条件で3日間培養した。その後葉片をMS培地(III)に移し1週間培養した後、MS培地(IV)に移し2週間ごとに植え継いだ。カルスが誘導され、シュート(shoot)が形成されたらメスでシュート(shoot)を切り取りMS培地(V)に移した。シュート(shoot)から根が出たものをバーミキュライトに植えかえ、ハイポネックス(ハイポネックス ジャパン)を与えて育て再生植物を得た。

前記の実験で使用したタバコ用MS培地の組成は次のとおりである。

主要な成分(Major elements) (g/L)

$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1.65
$\text{KNO}_3$	1.9
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.44
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.37
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.17

少量の成分(Minor element) (mg/L)

$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2	
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	
KI	0.83	
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	
Fe(III)Na-EDTA	0.042	mg/L
ミオイノシトール	100	mg/L
チアミン	5	mg/L
sucrose	30	g/L
ゲランガム	2	g/L

MS培地(I)は、前記の組成で作られ、これに下記の植物ホルモン及び/又は

抗生物質を加えて下記の他のMS培地を作った。

植物ホルモン	ベンジルアデニン (BA)	1.0 mg/L
	ナフタレン酢酸 (NAA)	0.1 mg/L
抗生物質	カナマイシン (kanamycin)	100 mg/L
	クラフォラン (claforan)	200 mg/L
MS 培地 (II)	MS 培地 (I) + BA + NAA	
MS 培地 (III)	MS 培地 (I) + BA + NAA + クラフォラン	
MS 培地 (IV)	MS 培地 (I) + BA + NAA + クラフォラン + カナマイシン	
MS 培地 (V)	MS 培地 (I) + カナマイシン	

#### 実施例 7 (サザン解析)

##### (1) タバコからのゲノムDNAの抽出

タバコからのゲノムDNAの抽出は「植物細胞工学シリーズ・植物のPCR実験プロトコール」(秀潤社)に従った。

乳鉢に、0.1～0.2 gの葉を入れ、液体窒素を加えて完全にすりつぶした。破碎物をエッペンドルフチューブに入れ、300  $\mu$ Lの2%CTAB溶液を加え、混合し、65℃で30分間加温した。等量のクロロホルム・イソアミルアルコール(24:1)を加え5分間混合した。

12000 rpmで15分間遠心し、上層を新しいチューブに移し、クロロホルム・イソアミルアルコール抽出をもう一度繰り返し、上層を新しいチューブに移した。1～1.5容量の1%CTAB溶液を加え、混合し、室温で1時間静置した後、8000 rpmで10分間遠心した。上清を捨て400  $\mu$ Lの1M CsClを加え、65℃で沈殿が完全に溶けるまで加温した。800  $\mu$ Lの100%エタノールを加え、混合し、-20℃で20分間静置後、12000 rpmで5分間遠心した。上清を捨て、70%エタノールで洗浄後、減圧乾燥したものを30  $\mu$ LのTE緩衝液に溶かした。

試薬            2% CTAB溶液

100 mM	トリス-HCl	(pH 8.0)
20 mM	EDTA	(pH 8.0)
1.4 M	NaCl	
2 %	CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)	

#### 1 % CTAB 溶液

50 mM	トリス-HCl	(pH 8.0)
20 mM	EDTA	(pH 8.0)
1 %	CTAB	

### (2) 制限酵素によるゲノムDNAの切断と電気泳動

制限酵素処理は、pCaMV35SからtNOSまでが切断されるEcoRI及びHindIIIの両者による消化と、pCaMV35Sの上流で切断されるHindIIIだけの消化を行った。

ゲノムDNA 10  $\mu$ gを、反応液量 100  $\mu$ Lとして終夜で制限酵素処理し、エタノール沈殿して20  $\mu$ LのTE緩衝液に溶解した。loading buffer 2  $\mu$ Lを加えて0.8%アガロースゲルで、60 Vで5時間、電気泳動した。泳動終了後、ゲルをエチジウムブロマイドで染色し、UVトランスイルミネーター上でスケールとともに写真を撮影した。

### (3) ブロッキングとハイブリダイゼーション

写真撮影後のゲルを蒸留水で洗浄し、0.2 N HCl中で10分間振盪した。ブロッキングの方法は「クローニングとシークエンス」(農村文化社)に従った。0.4 N NaOHでナイロンメンブレン(New Hybond-N+, Amersham)にトランスファーし、2xSSPEで5分洗った後室温で3時間乾燥した。ハイブリダイゼーションの方法は「バイオ実験イラストレイテッド・遺伝子解析の基礎」(秀潤社)を参照した。メンブレンをあらかじめ65℃に加温しておいた30 mLのハイブリダイゼーションバッファーでプレハイブリダイゼーションを65℃で1時間行い、ハイブリダイゼーションバッファーを交

換（25 mL）した。プローブを加え、65℃で12時間ハイブリダイゼーションを行った。メンブレンの洗浄はあらかじめ65℃に加温しておいた洗浄液で65℃10分を2回、high stringent 洗浄液で、65℃10分を1回行った。メンブレンをサランラップでつつみ、イメージングプレートに24時間感光させ、イメージアナライザー（Fuji Film製）で結果を確認した。

#### 試薬

##### 20xSSPE

3 M                      NaCl  
0.2 M                  NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1 mM                   EDTA

##### 1 M チャーチ・リン酸バッファー

800 mL程度の蒸留水に、NaHPO<sub>4</sub> 0.5 molを加え、H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>でpHを7.2に合わせた後、蒸留水で1 Lにし、オートクレーブ

##### ハイブリダイゼーションバッファー

0.5 M                  チャーチ・リン酸バッファー  
1 mM                   EDTA  
7 %                    SDS (v/v)

使用前に、denatured salmon sperm (1 mg/mL) を1/100 vol. 加える

##### 洗浄液

40 mM                  チャーチ・リン酸バッファー  
1 %                    SDS (v/v)

##### high stringent 洗浄液

0.2xSSPE  
0.1 %                  SDS (v/v)

#### (4) プローブの作成



refrelの全長断片を鋳型として、ランダムプライマーDNAラベリングキット第2版(Random Primer DNA Labeling Kit Ver. 2.0) (Takara製)を用いてプローブを作成(ただし $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ を用いた。)し、ProbeQuant™ G-50 Micro Columns (Pharmacia Biotech製)により未反応の $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ を除去した。

結果を第14図に示す。第14図の左側は、制限酵素EcoRI及びHindIIIの両者による消化を行ったものであり、右側は、HindIIIだけの消化を行ったものである。図中のW. T. は野生型を示す。

#### 実施例8 (ノーザン解析)

##### (1) 全RNAの抽出

実施例1と同様な方法により、refrelを遺伝子導入した形質転換タバコおよび野生型のタバコの葉から、全RNAを抽出した。

##### (2) RNAの電気泳動

泳動槽・ゲル受け・コームおよび三角フラスコはあらかじめアブソルブ(absolve (RNase 阻害剤 DUPONT製))処理をしておいた。20xMOPS 10mL、2.4gアガロース、100mL滅菌蒸留水を三角フラスコにいれ、電子レンジでアガロースを溶かした。約50℃まで冷えたところで、ホルムアルデヒド10mLを加え、滅菌蒸留水で200mLにしたものを固めてゲルに用いた。泳動槽に、約800mLの1xMOPSを入れ、10mg/mLのエチジウムブロマイド5μLを加え、泳動緩衝液とした。全RNA 10μgに16μLのRNA sample bufferを加え、滅菌蒸留水で20μLとし、65℃で10分間加温した後氷上で5分間静置したものを泳動した。泳動条件は、60Vで1時間泳動した後、電圧を120Vにしてさらに2時間泳動した。

#### 試薬

## 20 x M O P S

0.4 M	M O P S
0.1 M	N a O A c
0.02 M	E D T A

## R N A   s a m p l e   b u f f e r

ホルムアルデヒド	1.6	m L
ホルムアミド	5.0	m L
20 x M O P S	0.5	m L
グリセリン色素液	1.6	m L
合      計	8.7	m L

## グリセリン色素液

グリセリン	5 m L
ブロモフェノールブルー	1 m g
キシレンシアノール	1 m g
0.5 M E D T A (p H 8.0)	0.02 m L

## (3)    ブロッキングとハイブリダイゼーション

泳動終了後、ゲルを UV イルミネーターにのせスケールと共に写真を撮った。ブロッキングの方法は「クローニングとシークエンス」(農村文化社)に従い、20 x S S P Eで、RNAをゲルからナイロンメンブレン(New Hybond-N Amer sham)にトランスファーした。12時間後、メンブレンを、2 x S S P Eで5分間洗い、3時間室温で乾燥した後5分間UV照射してメンブレンにRNAを固定した。

ハイブリダイゼーションの方法はサザン解析の場合と同様に行った。

結果を第15図に示す。図中のW. T. は野生型を示す。野生型(W. T.)のレーンにはバンドは検出されなかった。No. 1とNo. 2のレーンには2.5 kbの大きさにメジャーなバンドが検出され、それより小さな位置にいくつかのバンドが検出された。

### 実施例 9 (三価鉄還元酵素活性の確認)

r e f r e l を遺伝子導入した形質転換体と野生型のタバコを、バーミキュライトに植え替えハイポネックス (H y p o n e x) を与えて育て、シュート (s h o o t) が 5 c m ~ 1 0 c m 位になったものを用いて三価鉄還元酵素活性を確認した。

三価鉄還元酵素活性の確認には、F e (I I) の強力なキレーターであるバソフエナンソロリンジスルホン酸 (b a t h o p h e n a n t h r o l i n e d i s u l f o n i c a c i d (B P D S)) が、F e (I I) と複合体を形成することで赤色を呈することを利用した。分析用緩衝液 (a s s a y b u f f e r) にアガロースを 0. 4 % になるように加え、電子レンジで溶解後、ある程度冷えてから 1 / 1 0 0 v o l. の 5 0 0 μ M F e (I I I) - E D T A と 1 / 1 0 0 v o l. の 5 0 0 μ M B P D S を加え、攪拌し容器に入れ、固まるまで待った。形質転換体と野生型のタバコのバーミキュライトを除いた後、根をゲルに寝かせアルミホイルで遮光して 2 7 ° C で 2 4 時間静置した。

同様の実験を再生植物の種子から発芽させた 2 世代目の形質転換植物で行った。このときの反応時間は 1 時間とした。

分析用緩衝液 (a s s a y b u f f e r)

0. 2 m M C a S O<sub>4</sub>

5. 0 m M M E S b u f f e r p H 5. 5

三価鉄還元酵素活性の確認の写真を第 1 6 図及び第 1 7 図に、2 世代目の三価鉄還元酵素活性の確認の写真を第 1 8 図に示した。形質転換体の根圏での発色から三価鉄の還元が確認された。

## 請 求 の 範 囲

1. 有用植物に他の種の遺伝子を導入して有用植物を形質転換する方法において、導入される他の遺伝子がコードする蛋白質が有する機能を実質的に変更することなく、当該他の遺伝子の塩基配列中に存在する形質転換される有用植物のmRNAのポリ(A)付加に関する要素の領域を、mRNAのポリ(A)付加に関係しないような他の塩基配列に改変することを特徴とする有用植物を形質転換する方法。
2. 導入される他の種の遺伝子が、酵母由来のものである請求の範囲第1項に記載の方法。
3. mRNAのポリ(A)付加に関する要素の領域が、AATAA様の塩基配列である請求の範囲第1項又は第2項に記載の方法。
4. mRNAのポリ(A)付加に関する要素の領域が、GTーリッチな塩基配列の下流側である請求の範囲第3項に記載の方法。
5. mRNAのポリ(A)付加に関する要素の領域の塩基配列の改変が、形質転換される有用植物のコドン利用率に基づいて行われる請求の範囲第1～4項のいずれかに記載の方法。
6. 塩基配列の改変が、塩基のG及びTが豊富な領域が少なくなるように行われることを特徴とする請求の範囲第1～5項のいずれかに記載の方法。
7. 塩基配列の改変が、導入される遺伝子の全領域にわたって塩基のG及びCの含有量の差が少ないことを特徴とする請求の範囲第1～6項のいずれかに記載の方法。
8. 塩基配列の改変が、ATTTA配列を有さないように行われることを特徴とする請求の範囲第1～7項のいずれかに記載の方法。
9. 導入される遺伝子の開始コドンの上流に、コザック配列(Kozak配列)を有することを特徴とする請求の範囲第1～8項のいずれかに記載の方法。
10. 導入される遺伝子が、栄養分の吸収に関与する蛋白質をコードするものである請求の範囲第1～9項のいずれかに記載の方法。
11. 導入される遺伝子が、三価鉄還元酵素FRE1をコードする遺伝子である

請求の範囲第 10 項に記載の方法。

12. 三価鉄還元酵素 FRE1 をコードする遺伝子が酵母由来のものである請求の範囲第 11 項に記載の方法。

13. 有用植物が、イネ科植物であることを特徴とする請求の範囲第 1 ～ 12 項のいずれかに記載の方法。

14. 有用植物が、タバコであることを特徴とする請求の範囲第 1 ～ 12 項のいずれかに記載の方法。

15. 請求の範囲第 1 ～ 14 項に記載の方法により製造され得る形質転換された有用植物。

16. 植物が種子である請求の範囲第 15 項に記載の植物。

17. 請求の範囲第 1 ～ 14 項のいずれかに記載の方法で使用され得る塩基配列が改変された塩基配列を有する核酸。

18. 核酸が DNA である請求の範囲第 17 項に記載の核酸。

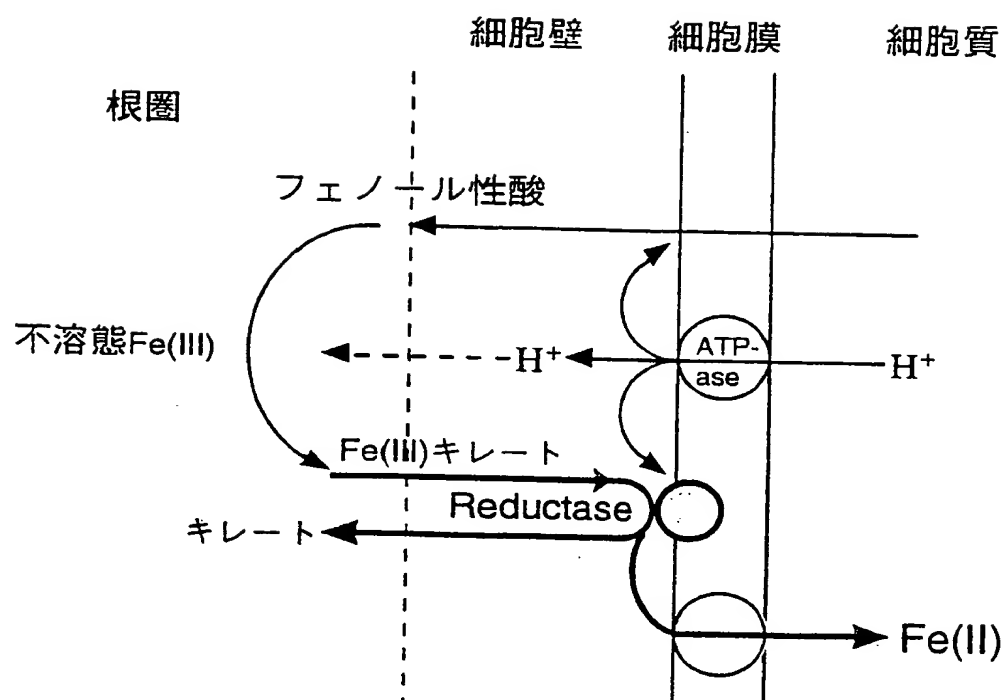
19. 導入されようとする遺伝子が、三価鉄還元酵素 FRE1 をコードする DNA である請求の範囲第 18 項に記載の DNA。

20. DNA が配列番号 1 に記載の塩基配列を有するものである請求の範囲第 19 項に記載の DNA。

21. 請求の範囲第 17 ～ 20 項のいずれかに記載の核酸を、数個のフラグメントに分割して、これらのフラグメントを結合させることを特徴とする請求の範囲第 17 ～ 20 項のいずれかに記載の核酸を製造する方法。



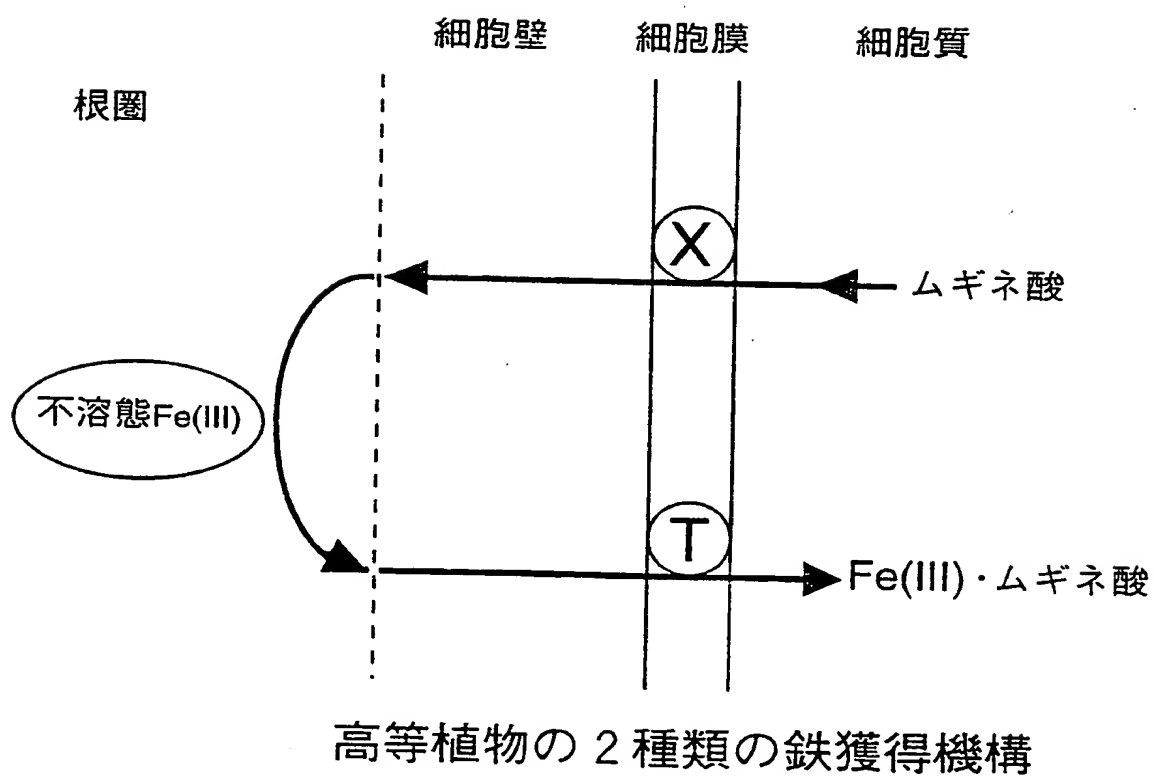
## 第 1 図





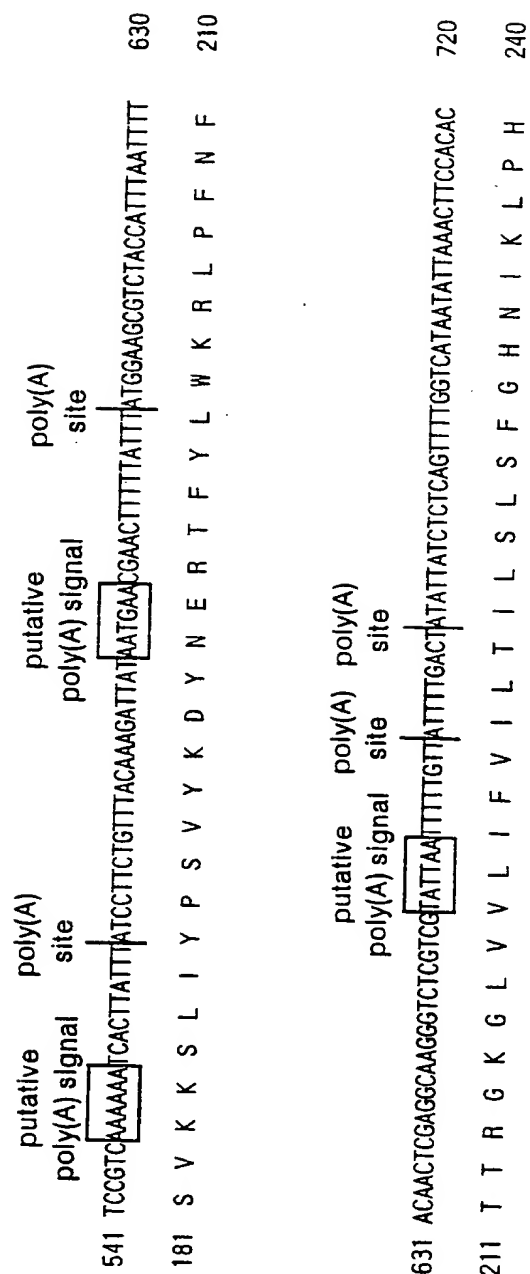


## 第 2 図





第 3 図



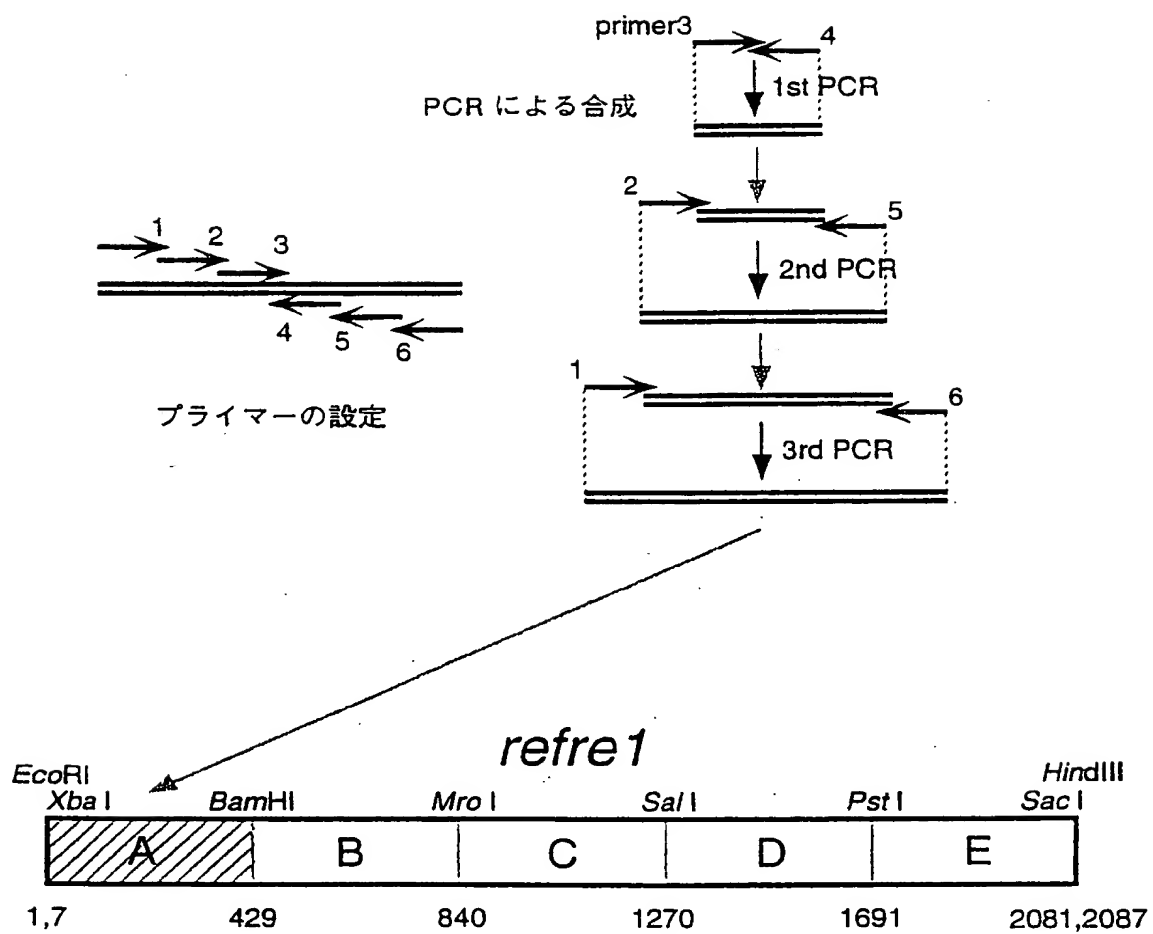


## 第 4 図

1 ATGGTTAGAACCCGTGTATTATTCTGCTTATTTATATCTTTTTTGCTACGGTTCAATCG 60  
 61 AGTGCTACACTTATTAGCACTTCATGTATTTCCCAAGCTGCGCTATACCAATTTGGATGT 120  
 121 TCTAGTAAATCTAAAAGTTGCTACTGTAAAAACATCAATTGGCTGGGTTCAAGTGACAGCA 180  
 181 TGTGCCTATGAGAATTCCAAATCTAACAAACACTAGACAGCGCCTTAATGAAGTTAGCA 240  
 241 TCCCAATGTTCAAGCATCAAAGTTTATACTTTAGAGGACATGAAGAATATTTATTTAAAT 300  
 301 GCGTCAAATTATTTGAGAGCACCTGAGAAAAGTGATAAAAAAACCGTGGTTAGTCAACCG 360  
 361 CTCATGGCGAACGAGACAGCGTATCATTATTATTATGAGGAAAATTATGGTATCCATCTT 420  
 421 AACCTAATGCGCTCTCAATGGTGGCGTTGGGTCTGGTCTCTCTGGGTTGGTGTGGT 480  
 481 ACTGCAGCCACTATCTTGAACATTCTGAAAAGGGTGTGGTAAGAACATCATGGCAAAC 540  
 541 TCCGTCAAAAAATCACTTATTTATCCTTCTGTTTACAAAGATTATAATGAACGAACCTTT 600  
 601 TATTTATGGAAGCGTCTACCATTTAATTTTACAACCTCGAGGCAAGGGTCTCGTCGTATTA 660  
 661 ATTTGTAAATGACTATATTATCTCTCAGTTTTGGTCATAATATTAACTTCCACAC 720  
 721 CCATATGATAGGCCAGATGGAGAAGAAGTATGGCCTTTGTGAGTCGTAGAGCAGACTTG 780  
 781 ATGGCCATTGCACTTTTCCAGTAGTCTATCTATTCGGAATAAGAAATAATCCCTTCATC 840  
 841 CCTATAACAGGGCTTTCCTTTTCTACATTTAATTTCTATCATAAATGGTCTGCCTACGTT 900  
 901 TGTTTCATGTTGGCCGTTGTACACTCAATTGTCTGACCGCCTCGGGAGTGAAAAGAGGT 960  
 961 GTTTCAAAGTCTGGTTAGGAAATTTTACTTAGGTGGGTATAGTGGCAACGATATTA 1020  
 1021 ATGTCTATTATTATTTTCAAAGTGAAAAAGTATTTAGAAATAGAGGGTATGAGATATTC 1080  
 1081 CTTCTTATTCATAAAGCGATGAATATTATGTTCAATTATGCCATGTACTACCATTGTCAC 1140  
 1141 ACCCGGGTGGATGGTGGATGGTCAATGGCTGGTATTTTATGCTTTGATAGATTG 1200  
 1201 TGCAGGATTGTTAGAATAATCATGAATGGTGGCTTGAAAACTGCTACTTTGAGTACCACT 1260  
 1261 GATGATTCTAATGTTATTAATAATTTTCAAGTAAAAAACCAAGTTTTTCAAGTACCAAGTA 1320  
 1321 GGAGCTTTTCGCATACATGTATTTCTTATCACCAAAAAGTGCATGGTTCTATAGTTTCCAA 1380  
 1381 TCACATCCATTTACAGTATTATCGGAACGACACCGTGATCCAAACAATCCAGATCAATTG 1440  
 1441 ACGATGTACGTAAAGGCAAATAAAGGTATCACTCGAGTTTTGTTATCGAAAGTTCTAAGT 1500  
 1501 GCTCCAAATCATACTGTTGATTGTAAATATTCCTTGAAAGGCCATATGGTGTAAACGGTT 1560  
 1561 CCACATATCGCTAAGCTAAAAAGAAATCTGGTAGGTGTAGCCGCGGTGGGTGTTGG 1620  
 1621 GCTATTTATCCGCACTTTGTGCAATGTTTACGGTTACCATCTACTGATCAACTTCAGCAT 1680  
 1681 AAATTTTACTGGATTGTTAATGACCTATCCATTTGAAATGGTTTGAAAATGAATTGCAA 1740  
 1741 TGGTTAAAGGAGAAAAAGTTGTGAAGTCTCAGTCATATATACTGGTTCCAGTGTGAGGAC 1800  
 1801 ACAAATTCAGATGAGAGTACAAAAGGTTTTGATGATAAAGAAGAAAGCGAAATCACTGTT 1860  
 1861 GAATGTCTCAATAAAAAGACCTGATTTGAAAGAACTAGTGGCTCGGAAATAAACTCTCA 1920  
 1921 GAACTAGAGAATAATAATATTACCTTTTATTCCTGCGGGCCAGCAACGTTTAACGACGAT 1980  
 1981 TTAGAAATGCAGTGGTCCAAGGTATAGACTCTTCTTGAAGATTGACGTTGAAGTAGAA 2040  
 2041 GAAGAAAGTTTTACATGGT 2059



## 第 5 図







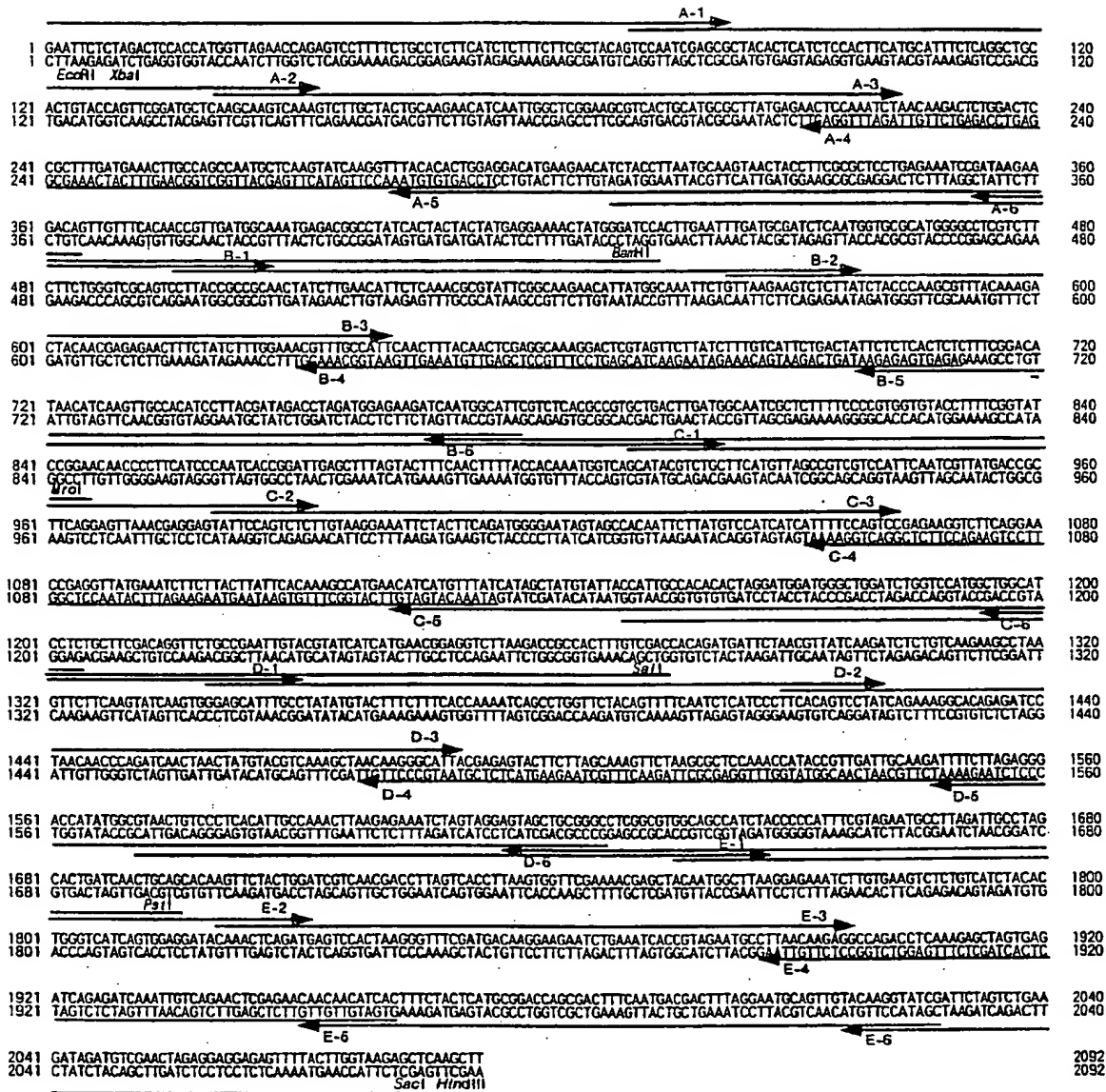
## 第 6 図

配列名      塩基配列

	5'		3'
A-1	GAATTCCTAGACTCCACCATGGTTAGAACCAGAGTCTTTTCTGGCTCTTCATCTCTTTCTTGGCTACAGTCCAATCGAGCG		83mer
A-2	GTCCAATCGAGCGCTACACTCATCTCCACTTCATGCATTTCTCAGGCTGCACTGTACCAGTTCGGATGCTCAAGCAAGTCAAA		83mer
A-3	CAAGCAAGTCAAAGTCTTGCTACTGCAAGAACATCAATTGGCTCGGAAGGSTCACTGCATGCGCTTATGAGAAGTCCAAATCT		83mer
A-4	TCCAGTGTGTAAACCTTGATACTTGAGCATTTGGCTGGCAAGTTTCATCAAGGSGAGTCCAGAGTCTTGTAGATTGGAGTT		83mer
A-5	TGTCTTCTATCGGATTTCTCAGGAGCGCGAAGGTAGTTACTTGCATTAAGGTAGATGTTCTTCATGTCTCCAGTGTGTAAA		83mer
A-6	GGATCCCATAGTTTTCCTCATAGTAGTAGTGATAGGCGGTCTCATTTCGCATCAACGGTTGTGAAACAACGTGCTTCTTATCG		83mer
B-1	GGATCCACTTGAATTTGATGCGATCTCAATGGTGGCATGGGGCTCGTCTTCTTCTGGGTGCGAGTCTTAACGGCGCA		80mer
B-2	CCTTACCGCCGCAACTATCTTGAACATCTCAAAGCGTATTCGGCAAGAACATTATGGCAAATCTGTTAAGAAGTCTC		80mer
B-3	GTTAAGAAGTCTCTTATCTACCAAGCGTTTACAAAGACTACAAGAGAGAAGTCTTATCTTTGGAAAAGTTTGCCATT		80mer
B-4	AGAGTGAGAGAATAGTCAGAAATGACAAGATAAGAACTACGAGTCTTTGGCTCGAGTTGTAAGTTGAATGGCAAGCGT		80mer
B-5	AATGCCATTGATCTTCTCCATCTAGGTCTATCGTAAGGATGTGGCAACTTGATGTTATGTCCGAAAGAGAGTGAGAGAAT		80mer
B-6	TCCGGATACCGAAAAGGTACACCAAGGGGAAAAGAGCGATTGCCATCAAGTCAGCAAGCGGTGAGAAGAAATGCCATTGAT		80mer
C-1	TCCGGAACAACCCCTTCATCCCAATCAAGGATTGAGCTTTAGTACTTTCAACTTTTACCACAAATGGTCAGCATAGTCTGC		83mer
C-2	GCATAGCTCTGCTTCATGTTAGCGGTGCTCCATTCAGTGTATGAAGCGCTTCAGGAGTTAAAGAGGAGTATTCAGTCTCT		83mer
C-3	TATTCAGTCTCTTGTAAGGAAATCTACTTCAGATGGGGAATAGTAGCCACAATCTTATGTCCATCATCTTTCCAGTCC		83mer
C-4	ATAACATGATGTTTCATGGCTTTGTGAATAAGTAAGAAGATTTCATAACCTCGGTTCTCGAAGACCTTCGGACTGGAAAAT		83mer
C-5	GAGGATGCCAGCATGGAACAGATCCAGCCCATCTAGTGTGTGGCAATGGTAATACATAGCTATGATAAATCATGATGT		83mer
C-6	GTGACAAAAGTGGCGTCTTAAGACCTCGGTTTCATGATGATAGTACAATTCCGCAGAACCTGTGGAAGCAGAGGATGCCAGC		83mer
D-1	GTGACACAGATGATTCTAACGTTATCAAGATCTCTGTCAAGAAGCTAAGTCTTCAAGTATCAAGTGGGAGCATTTCGC		82mer
D-2	GGAGCATTTGGCTATATGTACTTTCTTTCACCAAAATCAGCGTGGTTCTACAGTTTTCATCTCATCCCTTCACAGTCTAT		82mer
D-3	TTACAGTCTTATCAGAAAGGCACAGAGATCTAACAAACCCAGATCACTAACTATGTAAGTCAAGCTAACAAGGGCATTAA		82mer
D-4	CCTCTAAGAAAATCTTGCAATCAAGGATGGTTTGGAGCGCTTAGAAGTTTGTCTAAGAAGTACTCTGTAATGCCCTTGTT		82mer
D-5	GGCCCGCAGCTACTCTACTAGATTTCTCTTAAGTTTGGCAATGTGAGGGACAGTTACGCCATATGGTCCCTCTAAGAAAAT		82mer
D-6	CTGCAGTTGATCAGTGCTAGGCAATCTAAGGCATTTCTACGAAATGGGGTAGATGGCTGCCACGCGAGGCGCCAGCTACT		82mer
E-1	CTGCAGCACAAGTTCTACTGATGCTCAACGACCTTAGTCACTTAAGTGGTTGAAAAACGAGCTACAATGSCCTTAA		77mer
E-2	ACAATGGCTTAAGGAGAAATCTTGTAAGTCTCTGTCTATCTACACTGGGTATCAGTGGAGGATACAACTCAGATG		77mer
E-3	CAAACTCAGATGAGTCCACTAAGGGTTTGGATGACAAGGAAGATCTGAAATCAACGATAGAAATGCCCTAACAAGAGG		77mer
E-4	GTGATGTTGTTGTTCTCGAGTCTGACAAATTGATCTCTGATCTCACTAGCTCTTGAGGTCTGGCTCTTGTTAAG		77mer
E-5	CGATACCTTGTAACACTGCATTTCTAAAGTGGTCTTGAAGTGGTGGTCCGATGAGTAGAAAGTGATGTTGTTG		77mer
E-6	AAGCTTGAGCTCTTAACAAAGTAAACTCTCTCTCTAGTTGACATCTATCTTCAGACTAGAAATGATAACCTTGTA		77mer

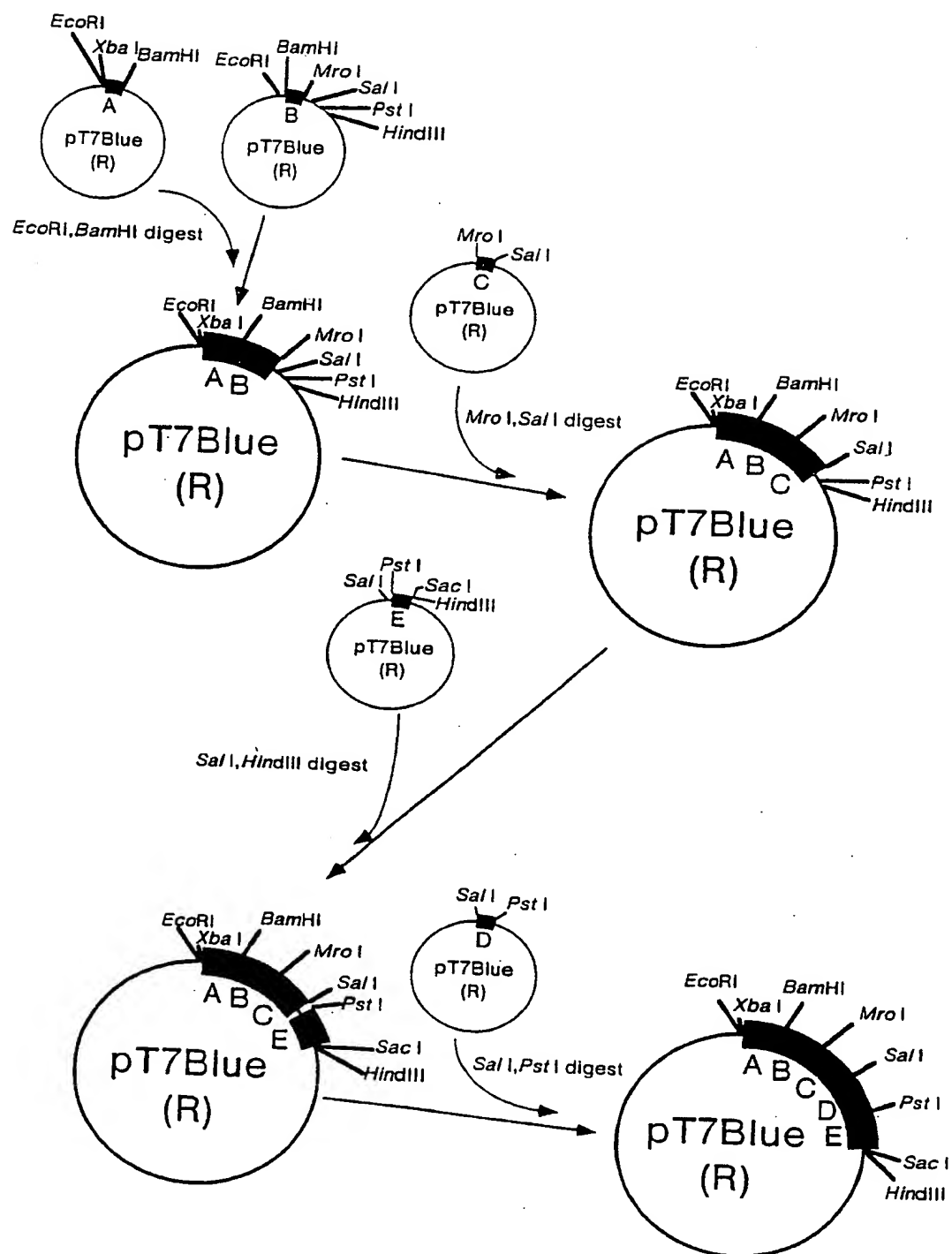


## 第 7 図





第 8 図





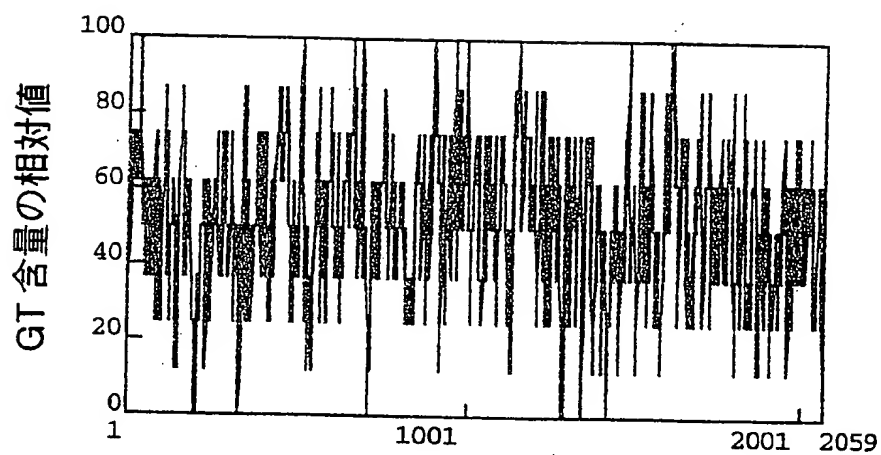
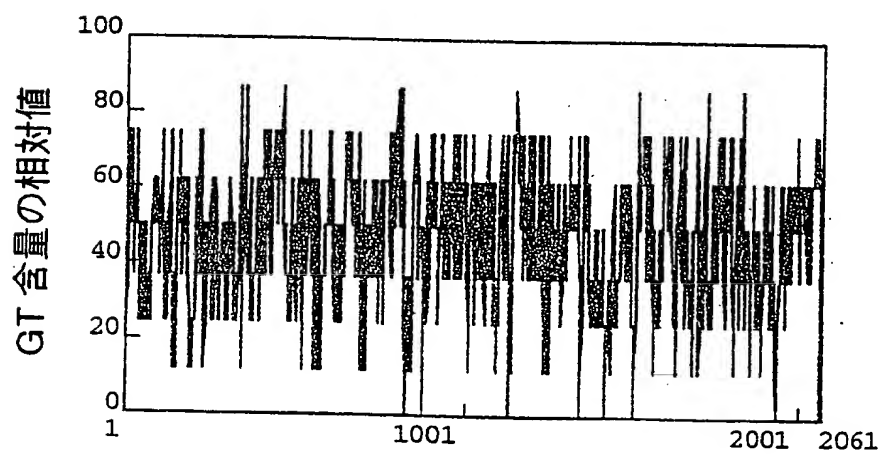
## 第 9 図

1	gaattctctagactccacc	19
20	ATGGTTAGAACCCAGAGTCCTTTCTGCCTCTTCATCTCTTTCTCGCTACAGTCCAATCGAGCGCTACACTCATCTCCACTTCATGCATT	109
1	L M V R T R V L F C L F I S F F A T V Q S S A T L I S T S C I	30
110	TCTCAGGCTGCAGTGTACCACTCGGATGCTCAAGCAAGTCAAAGTCTTGCTACTGCAAGAACATCAATTGGCTCGGAAGCGTCACTGCA	199
31	S Q A A L Y Q F G C S S K S K S C Y C K N I N W L G S V T A	60
200	TGGCTTATGAGAACTCCAAATCTAACAAGACTCTGGACTCCGCTTTGATGAAACTTGCCAGCCAATGCTCAAGTATCAAGGTTTACACA	289
61	C A Y E N S K S N K T L D S A L M K L A S O C S S I K V Y T	90
290	CTGGAGGACATGAAGAACATCTACCTTAATGCAAGTAACCTTCGCGCTCTGAGAAATCCGATAAGAAGACAGTTGTTTCAACACCG	379
91	L E D M K N I Y L N A S N Y L R A P E K S D K K T V V S O P	120
380	TTGATGGCAATGAGACGGCTATCACTACTACTATGAGGAAAATATGGGATCCACTTGAATTTGATGCGATCTCAATGGTGGCATGG	469
121	L M A N E T A Y H Y Y Y E E N Y G I H L N L M R S O W C A W	150
470	GGCTCGTCTTCTTCTGGGTCGAGTCTTACCGCCCAACTATCTTGAACATCTCAACCGGTATTCGGCAAGAACATTATGGCAAT	559
151	G L V F F W V A V L T A A T I L N I L K R V F G K N I M A N	180
560	TCTGTAAAGAGTCTCTTATCTACCCAAGCGTTTACAAGACTACAACGAGAGAACTTCTATCTTTGGAAACGTTTGCATTCAACTTT	649
181	S V K K S L I Y P S V Y K D Y N E R T F Y L W K R L P F N F	210
650	ACAACTCGAGGCAAGGACTCGTAGTCTTATCTTTGTCATTCTGACTATTCTCTCACTCTTTTCGACATAACATCAAGTGGCACAT	739
211	T T R G K G L V V L I F V I L T I L S L S F G H N I K L P H	240
740	CCTTACGATAGACCTAGATGGAGAAGATCAATGGCATTCTGCTCAGCGCTGCTGACTTGATGGCAATCGCTCTTTTCCCGTGGTGTAC	829
241	P Y D R P R W R R S M A F V S R R A D L M A I A L F P V V Y	270
830	CTTTTCGATATCCGGAACAACCCCTTCACTCCAATCACCAGGATTGAGCTTTAGTACTTTCACTTTTACCACAAATGGTCAGCATACGTC	919
271	L F G I R N N P F I P I T G L S F S T F N F Y H K W S A Y V	300
920	TGCTTCATGTTAGCGCTGCTCAATCAATCGTTATGACCGCTTCAGGAGTTAAACGAGGAGTATTCAGTCTCTTGTGAAGAAATCTAC	1009
301	C F M L A V V H S I V M T A S G V K R G V F Q S L V R K F Y	330
1010	TTAGATGGGGAATAGTAGCCACAATCTTATGTCCATCATCATTTTCCAGTCCGAGAAGGCTCTCAGGAACCGAGGTTATGAAATCTTC	1099
331	F R W G I V A T I L M S I I I F Q S E K V F R N R G Y E I F	360
1100	TTACTTATTCACAAAGCCATGAACATCATGTTTATCATAGCTATGTATTACCATTTGCCACACACTAGGATGGATGGGCTGGATCTGGTCC	1189
361	L L I H K A M N I M F I I A M Y Y H C H T L G W M G W I W S	390
1190	ATGGCTGCATCTCTGCTTCGACAGGTTCTCGCAATTGTACGTATCATGAACGGAGGTCCTTAAGACCGCCACTTTGTGCACACACA	1279
391	M A G I L C F D R F C R I V R I I M N G G L K T A T L S T T	420
1280	GATGATTCATACGTTATCAAGATCTCTGTCAAGAAGCCTAAGTTCTTCAAGTATCAAGTGGGAGCATTTCCTATATGTACTTCTTTCA	1369
421	D D S N V I K I S V K K P K F F K Y O V G A F A Y M Y F L S	450
1370	CCAAATCAGCCTGGTTCTACAGTTTCAATCTCATCCCTTCACAGTCTATCAGAAAGGCACAGAGATCCTAACAACCCAGATCAACTA	1459
451	P K S A W F Y S F Q S H P F T V L S E R H R D P N N P D O L	480
1460	ACTATGTACGTCAAAGCTAAAGGGCATTACGAGAGTACTTCTTAGCAAAGTTCTAAGCGCTCCAAACCATACCGTTGATTGCAAGATT	1549
481	T M Y V K A N K G I T R V L L S K V L S A P N H T V D C K I	510
1550	TTCTTAGAGGGACCATATGGCGTAAGTGTCCCTCACATTGCCAAACTTAAGAGAAATCTAGTAGGAGTAGCTCGGGCCTCGCGGTGCA	1639
511	F L E G P Y G V T V P H I A K L K R N L V G V A A G L G V A	540
1640	GCCATCTACCCCATTTCTGATAGAATGCCCTAGATTGCCTAGCACTGATCAACTGCAGCACAAGTTCTACTGGATCGTCAACGACCTTAGT	1729
541	A I Y P H F V E C L R L P S T D O L Q H K F Y W I V N D L S	570
1730	CACCTTAAGTGGTTCGAAAACGAGCTACAATGGCTTAAGGAGAAATCTTGTGAAGTCTCTGTATCTACACTGGGTATCAGTGGAGGAT	1819
571	H L K W F E N E L Q W L K E K S C E V S V I Y T G S S V E D	600
1820	ACAACTCAGATGAGTCCACTAAGGTTTCGATGACAAGGAAGATCTGAAATCACCGTAGAATGCCTTAACAAGAGGCCAGACCTCAAA	1909
601	T N S D E S T K G F D D K E E S E I T V E C L N K R P D L K	630
1910	GAGCTAGTGAGATCAGAGATCAAAATGTGAGAAGTCAAGCAACATCACTTTCTACTCATCGGACCGAGGACTTTCAATGACGAC	1999
631	E L V R S E I K L S E L E N N N I T F Y S C G P A T F N D D	660
2000	TTTAGGAATGCAGTTGTACAAGGATCGATTCTAGTCTGAAGATAGATGTGAACTAGAGGAGGAGTTTACTTGGTAAGagctcaag	2089
661	F R N A V V Q G I D S S L K I D V E L E E E S F T W *	687
2090	ctt	2092



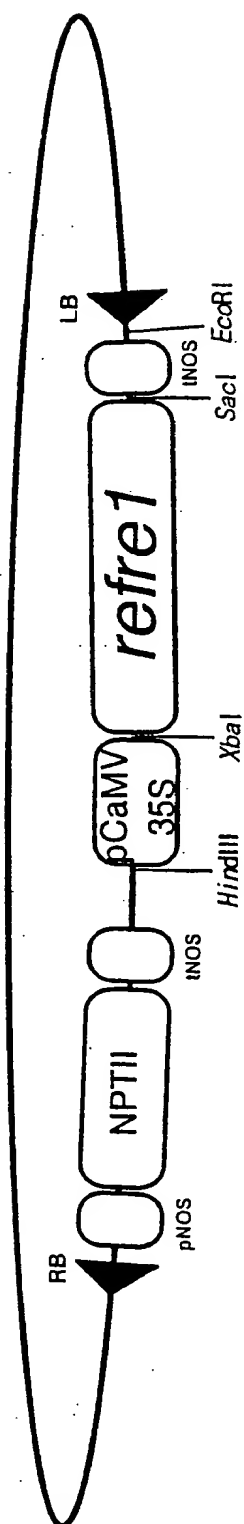


## 第 10 図

*FRE1**refre1*



第 11 図





第 1 2 図





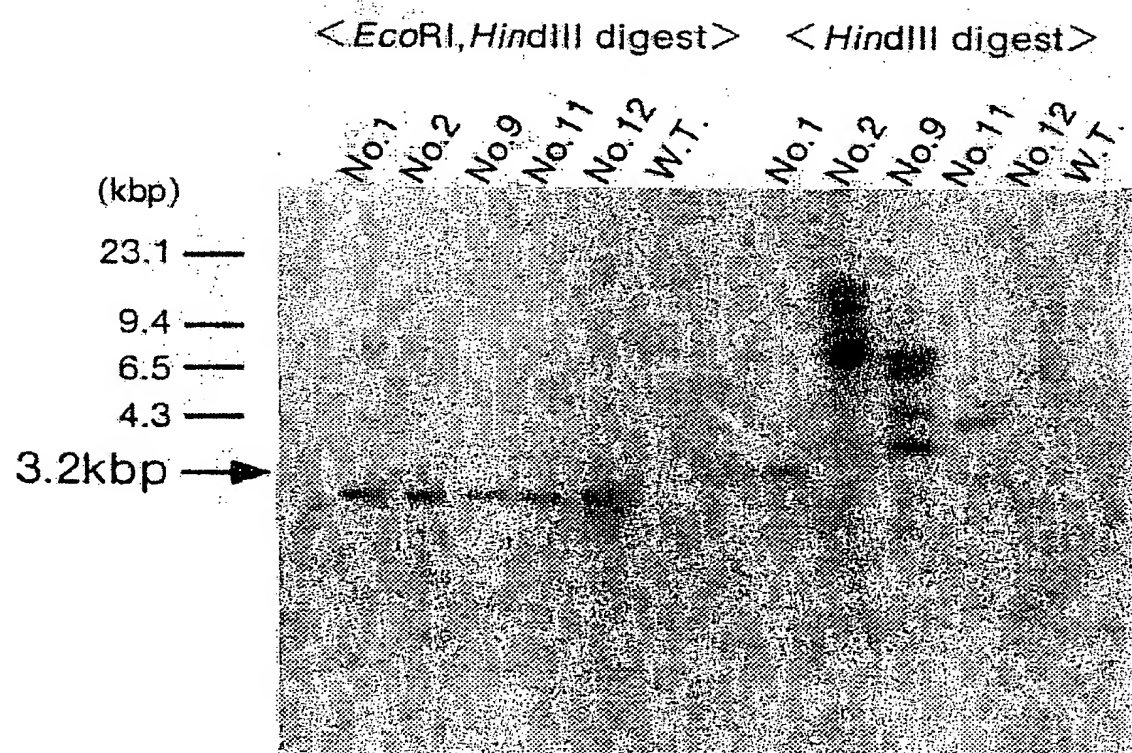
第 13 図





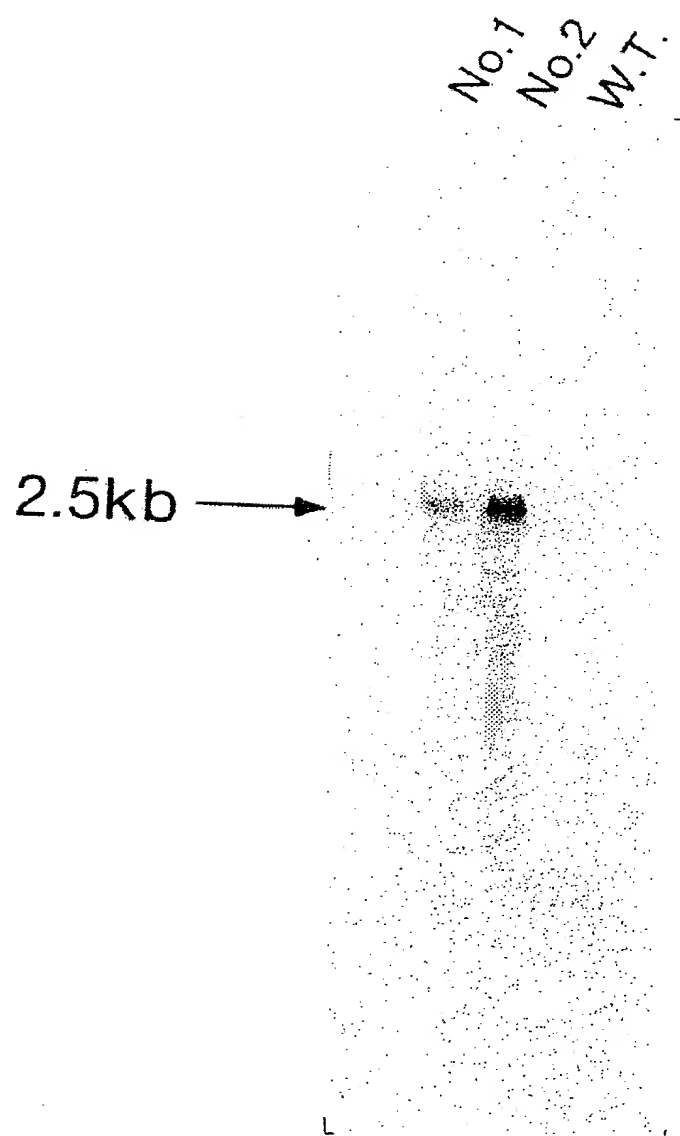


## 第 1 4 図





第 15 図





第 16 図





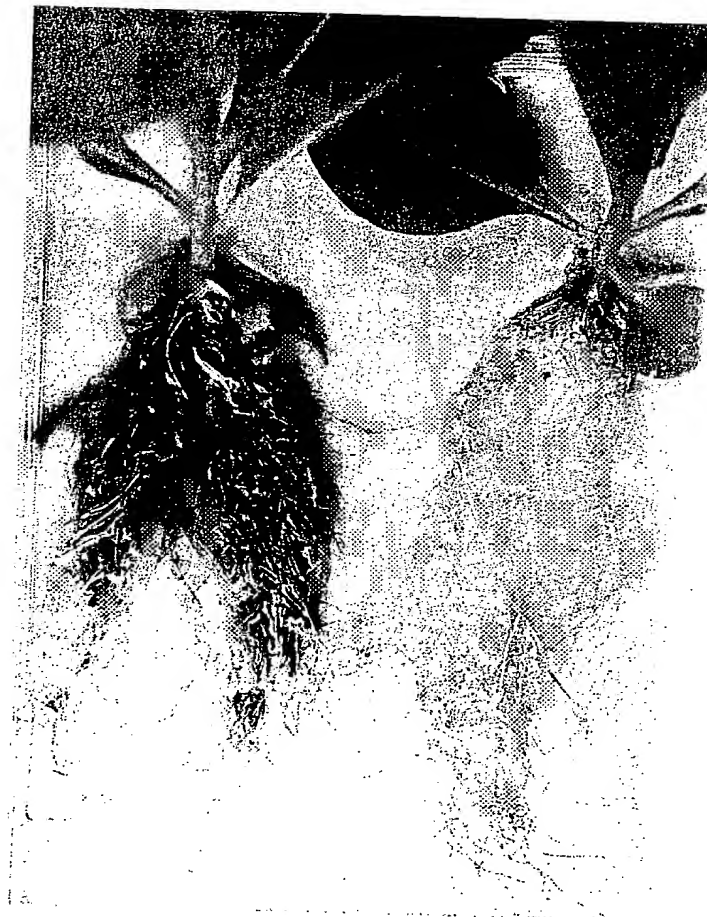
第 17 図







第 18 図



T<sub>2</sub>植物



## 配列表

出願人氏名：科学技術振興事業団

発明の名称：植物を形質転換する方法及びその植物並びにその遺伝子

整理番号：J A 9 0 8 1 5 5

出願番号：2 4 . 0 3 . 9 9 提出の国際出願

出願日：1 9 9 9 年 3 月 2 4 日

優先権番号：平成 1 0 年特許願第 9 6 6 3 7 号

優先日：平成 1 0 年 3 月 2 4 日

配列の数：3 4

配列番号：1

配列の長さ：2 0 9 2

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成 D N A

配列の特徴：

特徴を表す記号：modified base

配列：

GAATTCTCTA GACTCCACCA TGGTTAGAAC CAGAGTCCTT TTCTGCCTCT TCATCTCTTT 60

CTTCGCTACA GTCCAATCGA GCGCTACACT CATCTCCACT TCATGCATTT CTCAGGCTGC 120

ACTGTACCAG TTCGGATGCT CAAGCAAGTC AAAGTCTTGC TACTGCAAGA ACATCAATTG 180

GCTCGGAAGC GTCAGTGCAT GCGCTTATGA GAACTCCAAA TCTAACAAGA CTCTGGACTC 240

CGCTTTGATG AAAC TTGCCA GCCAATGCTC AAGTATCAAG GTTTACACAC TGGAGGACAT 300



GAAGAACATC TACCTTAATG CAAGTAACTA CCTTCGCGCT CCTGAGAAAT CCGATAAGAA 360  
GACAGTTGTT TCACAACCGT TGATGGCAA TGAGACGGCC TATCACTACT ACTATGAGGA 420  
AAACTATGGG ATCCACTTGA ATTTGATGCG ATCTCAATGG TCGGCATGGG GCCTCGTCTT 480  
CTTCTGGGTC GCAGTCCTTA CCGCCGCAAC TATCTTGAAC ATTCTCAAAC GCGTATTCGG 540  
CAAGAACATT ATGGCAAATT CTGTTAAGAA GTCTCTTATC TACCCAAGCG TTTACAAAGA 600  
CTACAACGAG AGAACTTTCT ATCTTTGGAA ACGTTTGCCA TTCAACTTTA CAACTCGAGG 660  
CAAAGGACTC GTAGTTCTTA TCTTTGTCAT TCTGACTATT CTCTCACTCT CTTTCGGACA 720  
TAACATCAAG TTGCCACATC CTTACGATAG ACCTAGATGG AGAAGATCAA TGGCATTTCGT 780  
CTCACGCCGT GCTGACTTGA TGGCAATCGC TCTTTTCCCC GTGGTGTACC TTTTCGGTAT 840  
CCGGAACAAC CCCTTCATCC CAATCACCGG ATTGAGCTTT AGTACTTTCA ACTTTTACCA 900  
CAAATGGTCA GCATACGTCT GCTTCATGTT AGCCGTCGTC CATTCAATCG TTATGACCGC 960  
TTCAGGAGTT AAACGAGGAG TATTCCAGTC TCTTGTAAGG AAATTCTACT TCAGATGGGG 1020  
AATAGTAGCC ACAATTCTTA TGTCCATCAT CATTTTCCAG TCCGAGAAGG TCTTCAGGAA 1080  
CCGAGGTTAT GAAATCTTCT TACTTATTCA CAAAGCCATG AACATCATGT TTATCATAGC 1140  
TATGTATTAC CATTGCCACA CACTAGGATG GATGGGCTGG ATCTGGTCCA TGGCTGGCAT 1200



CCTCTGCTTC GACAGGTTCT GCCGAATTGT ACGTATCATC ATGAACGGAG GTCTTAAGAC 1260

CGCCACTTTG TCGACCACAG ATGATTCTAA CGTTATCAAG ATCTCTGTCA AGAAGCCTAA 1320

GTTCTTCAAG TATCAAGTGG GAGCATTTCG CTATATGTAC TTTCTTTCAC CAAAATCAGC 1380

CTGGTTCTAC AGTTTTCAAT CTCATCCCTT CACAGTCCTA TCAGAAAGGC ACAGAGATCC 1440

TAACAACCCA GATCAACTAA CTATGTACGT CAAAGCTAAC AAGGGCATT ACGAGAGTACT 1500

TCTTAGCAAA GTTCTAAGCG CTCCAAACCA TACCGTTGAT TGCAAGATTT TCTTAGAGGG 1560

ACCATATGGC GTAACGTGCC CTCACATTGC CAAACTTAAG AGAAATCTAG TAGGAGTAGC 1620

TGCGGGCCTC GCGGTGGCAG CCATCTACCC CCATTTTCGTA GAATGCCTTA GATTGCCTAG 1680

CACTGATCAA CTGCAGCACA AGTTCTACTG GATCGTCAAC GACCTTAGTC ACCTTAAGTG 1740

GTTTCGAAAAC GAGCTACAAT GGCTTAAGGA GAAATCTTGT GAAGTCTCTG TCATCTACAC 1800

TGGGTCATCA GTGGAGGATA CAAACTCAGA TGAGTCCACT AAGGGTTTCG ATGACAAGGA 1860

AGAATCTGAA ATCACCGTAG AATGCCTTAA CAAGAGGCCA GACCTCAAAG AGCTAGTGAG 1920

ATCAGAGATC AAATTGTCAG AACTCGAGAA CAACAACATC ACTTTCTACT CATGCGGACC 1980

AGCGACTTTC AATGACGACT TTAGGAATGC AGTTGTACAA GGTATCGATT CTAGTCTGAA 2040

GATAGATGTC GAACTAGAGG AGGAGAGTTT TACTTGGTAA GAGCTCAAGC TT 2092





配列番号 : 2

配列の長さ : 6 8 7

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

生物名 : 酵母

配列 :

Met Val Arg Thr Arg Val Leu Phe Cys Leu Phe Ile Ser Phe Phe	15
Ala Thr Val Gln Ser Ser Ala Thr Leu Ile Ser Thr Ser Cys Ile	30
Ser Gln Ala Ala Leu Tyr Gln Phe Gly Cys Ser Ser Lys Ser Lys	45
Ser Cys Tyr Cys Lys Asn Ile Asn Trp Leu Gly Ser Val Thr Ala	60
Cys Ala Tyr Glu Asn Ser Lys Ser Asn Lys Thr Leu Asp Ser Ala	75
Leu Met Lys Leu Ala Ser Gln Cys Ser Ser Ile Lys Val Tyr Thr	90
Leu Glu Asp Met Lys Asn Ile Tyr Leu Asn Ala Ser Asn Tyr Leu	105
Arg Ala Pro Glu Lys Ser Asp Lys Lys Thr Val Val Ser Gln Pro	120
Leu Met Ala Asn Glu Thr Ala Tyr His Tyr Tyr Tyr Glu Glu Asn	135
Tyr Gly Ile His Leu Asn Leu Met Arg Ser Gln Trp Cys Ala Trp	150
Gly Leu Val Phe Phe Trp Val Ala Val Leu Thr Ala Ala Thr Ile	165



Leu Asn Ile Leu Lys Arg Val Phe Gly Lys Asn Ile Met Ala Asn	180
Ser Val Lys Lys Ser Leu Ile Tyr Pro Ser Val Tyr Lys Asp Tyr	195
Asn Glu Arg Thr Phe Tyr Leu Trp Lys Arg Leu Pro Phe Asn Phe	210
Thr Thr Arg Gly Lys Gly Leu Val Val Leu Ile Phe Val Ile Leu	225
Thr Ile Leu Ser Leu Ser Phe Gly His Asn Ile Lys Leu Pro His	240
Pro Tyr Asp Arg Pro Arg Trp Arg Arg Ser Met Ala Phe Val Ser	255
Arg Arg Ala Asp Leu Met Ala Ile Ala Leu Phe Pro Val Val Tyr	270
Leu Phe Gly Ile Arg Asn Asn Pro Phe Ile Pro Ile Thr Gly Leu	285
Ser Phe Ser Thr Phe Asn Phe Tyr His Lys Trp Ser Ala Tyr Val	300
Cys Phe Met Leu Ala Val Val His Ser Ile Val Met Thr Ala Ser	315
Gly Val Lys Arg Gly Val Phe Gln Ser Leu Val Arg Lys Phe Tyr	330
Phe Arg Trp Gly Ile Val Ala Thr Ile Leu Met Ser Ile Ile Ile	345
Phe Gln Ser Glu Lys Val Phe Arg Asn Arg Gly Tyr Glu Ile Phe	360
Leu Leu Ile His Lys Ala Met Asn Ile Met Phe Ile Ile Ala Met	375
Tyr Tyr His Cys His Thr Leu Gly Trp Met Gly Trp Ile Trp Ser	390



Met Ala Gly Ile Leu Cys Phe Asp Arg Phe Cys Arg Ile Val Arg	405
Ile Ile Met Asn Gly Gly Leu Lys Thr Ala Thr Leu Ser Thr Thr	420
Asp Asp Ser Asn Val Ile Lys Ile Ser Val Lys Lys Pro Lys Phe	435
Phe Lys Tyr Gln Val Gly Ala Phe Ala Tyr Met Tyr Phe Leu Ser	450
Pro Lys Ser Ala Trp Phe Tyr Ser Phe Gln Ser His Pro Phe Thr	465
Val Leu Ser Glu Arg His Arg Asp Pro Asn Asn Pro Asp Gln Leu	480
Thr Met Tyr Val Lys Ala Asn Lys Gly Ile Thr Arg Val Leu Leu	495
Ser Lys Val Leu Ser Ala Pro Asn His Thr Val Asp Cys Lys Ile	510
Phe Leu Glu Gly Pro Tyr Gly Val Thr Val Pro His Ile Ala Lys	525
Leu Lys Arg Asn Leu Val Gly Val Ala Ala Gly Leu Gly Val Ala	540
Ala Ile Tyr Pro His Phe Val Glu Cys Leu Arg Leu Pro Ser Thr	555
Asp Gln Leu Gln His Lys Phe Tyr Trp Ile Val Asn Asp Leu Ser	570
His Leu Lys Trp Phe Glu Asn Glu Leu Gln Trp Leu Lys Glu Lys	585
Ser Cys Glu Val Ser Val Ile Tyr Thr Gly Ser Ser Val Glu Asp	600
Thr Asn Ser Asp Glu Ser Thr Lys Gly Phe Asp Asp Lys Glu Glu	615



Ser Glu Ile Thr Val Glu Cys Leu Asn Lys Arg Pro Asp Leu Lys 630  
Glu Leu Val Arg Ser Glu Ile Lys Leu Ser Glu Leu Glu Asn Asn 645  
Asn Ile Thr Phe Tyr Ser Cys Gly Pro Ala Thr Phe Asn Asp Asp 660  
Phe Arg Asn Ala Val Val Gln Gly Ile Asp Ser Ser Leu Lys Ile 675  
Asp Val Glu Leu Glu Glu Glu Ser Phe Thr Trp \*\*\* 687

配列番号 : 3

配列の長さ : 17

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

GACTCGAGTC GACATCG

17

配列番号 : 4

配列の長さ : 24

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA





配列の特徴：

特徴を表す記号： primer bind

配列：

ACACTTATTA GCACTTCATG TATT

24

配列番号 : 5

配列の長さ : 8 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴：

特徴を表す記号： primer bind

配列：

GAATTCTCTA GACTCCACCA TGGTTAGAAC CAGAGTCCTT TTCTGCCTCT TCATCTCTTT 60

CTTCGCTACA GTCCAATCGA GCG 83

配列番号 : 6

配列の長さ : 8 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴：

特徴を表す記号： primer bind

配列：



GTCCAATCGA GCGCTACACT CATCTCCACT TCATGCATTT CTCAGGCTGC ACTGTACCAG 60

TTCGGATGCT CAAGCAAGTC AAA 83

配列番号 : 7

配列の長さ : 8 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

CAAGCAAGTC AAAGTCTTGC TACTGCAAGA ACATCAATTG GCTCGGAAGC GTCAGTGCAT 60

GCGCTTATGA GAACTCCAAA TCT 83

配列番号 : 8

配列の長さ : 8 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

TCCAGTGTGT AAACCTTGAT ACTTGAGCAT TGGCTGGCAA GTTTCATCAA AGCGGAGTCC 60



AGAGTCTTGT TAGATTGGA GTT

83

配列番号 : 9

配列の長さ : 8 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

TGTCTTCTTA TCGGATTTCT CAGGAGCGCG AAGGTAGTTA CTTGCATTAA GGTAGATGTT 60

CTTCATGTCC TCCAGTGTGT AAA

83

配列番号 : 1 0

配列の長さ : 8 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

GGATCCCATA GTTTTCTCA TAGTAGTAGT GATAGGCCGT CTCATTTGCC ATCAACGGTT 60

GTGAAACAAC TGTCTTCTTA TCG

83



配列番号 : 1 1

配列の長さ : 8 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成 D N A

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

GGATCCACTT GAATTTGATG CGATCTCAAT GGTGCGCATG GGGCCTCGTC TTCTTCTGGG 60

TCGCAGTCCT TACCGCCGCA 80

配列番号 : 1 2

配列の長さ : 8 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成 D N A

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

CCTTACCGCC GCAACTATCT TGAACATTCT CAAACGCGTA TTCGGCAAGA ACATTATGGC 60

AAATTCTGTT AAGAAGTCTC 80





配列番号 : 1 3

配列の長さ : 8 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成 DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

GTTAAGAAGT CTCTTATCTA CCCAAGCGTT TACAAAGACT ACAACGAGAG AACTTTCTAT 60

CTTTGGAAAC GTTTGCCATT 80

配列番号 : 1 4

配列の長さ : 8 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成 DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

AGAGTGAGAG AATAGTCAGA ATGACAAAGA TAAGAACTAC GAGTCCTTTG CCTCGAGTTG 60

TAAAGTTGAA TGGCAAACGT 80

配列番号 : 1 5

配列の長さ : 8 0



配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成 D N A

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

AATGCCATTG ATCTTCTCCA TCTAGGTCTA TCGTAAGGAT GTGGCAACTT GATGTTATGT 60

CCGAAAGAGA GTGAGAGAAT 80

配列番号 : 1 6

配列の長さ : 8 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成 D N A

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

TCCGGATACC GAAAAGGTAC ACCACGGGGA AAAGAGCGAT TGCCATCAAG TCAGCACGGC 60

GTGAGACGAA TGCCATTGAT 80

配列番号 : 1 7

配列の長さ : 8 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖



トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴：

特徴を表す記号： primer bind

配列：

TCCGGAACAA CCCCTTCATC CCAATCACCG GATTGAGCTT TAGTACTTTC AACTTTTACC 60

ACAAATGGTC AGCATACGTC TGC 83

配列番号：18

配列の長さ：83

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴：

特徴を表す記号： primer bind

配列：

GCATACGTCT GCTTCATGTT AGCCGTCGTC CATTCAATCG TTATGACCGC TTCAGGAGTT 60

AAACGAGGAG TATTCCAGTC TCT 83

配列番号：19

配列の長さ：83

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA



配列の特徴：

特徴を表す記号： primer bind

配列：

TATTCCAGTC TCTTGTAAGG AAATTCTACT TCAGATGGGG AATAGTAGCC ACAATTCTTA 60

TGTCCATCAT CATTTTCCAG TCC 83

配列番号 : 2 0

配列の長さ : 8 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴：

特徴を表す記号： primer bind

配列：

ATAAACATGA TGTTTCATGGC TTTGTGAATA AGTAAGAAGA TTTCATAACC TCGGTTTCCTG 60

AAGACCTTCT CGGACTGGAA AAT 83

配列番号 : 2 1

配列の長さ : 8 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴：

特徴を表す記号： primer bind





配列：

GAGGATGCCA GCCATGGACC AGATCCAGCC CATCCATCCT AGTGTGTGGC AATGGTAATA 60

CATAGCTATG ATAAACATGA TGT 83

配列番号 : 2 2

配列の長さ : 8 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列：

GTCGACAAAG TGGCGGTCTT AAGACCTCCG TTCATGATGA TACGTACAAT TCGGCAGAAC 60

CTGTCGAAGC AGAGGATGCC AGC 83

配列番号 : 2 3

配列の長さ : 8 2

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列：

GTCGACCACA GATGATTCTA ACGTTATCAA GATCTCTGTC AAGAAGCCTA AGTTCTTCAA 60



GTATCAAGTG GGAGCATTTG CC

82

配列番号 : 2 4

配列の長さ : 8 2

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

GGAGCATTTG CCTATATGTA CTTTCTTTCA CCAAAATCAG CCTGGTTCTA CAGTTTTCAA 60

TCTCATCCCT TCACAGTCCT AT 82

配列番号 : 2 5

配列の長さ : 8 2

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

TTCACAGTCC TATCAGAAAG GCACAGAGAT CCTAACAACC CAGATCAACT AACTATGTAC 60

GTCAAAGCTA ACAAGGGCAT TA 82



配列番号 : 2 6

配列の長さ : 8 2

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成 D N A

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

CCTCTAAGAA AATCTTGCAA TCAACGGTAT GGTTTGGAGC GCTTAGAACT TTGCTAAGAA 60

GTACTCTCGT AATGCCCTTG TT 82

配列番号 : 2 7

配列の長さ : 8 2

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成 D N A

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

GGCCCGCAGC TACTCCTACT AGATTTCTCT TAAGTTTGGC AATGTGAGGG ACAGTTACGC 60

CATATGGTCC CTCTAAGAAA AT 82



配列番号 : 2 8

配列の長さ : 8 2

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成 DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

CTGCAGTTGA TCAGTGCTAG GCAATCTAAG GCATTCTACG AAATGGGGGT AGATGGCTGC 60

CACGCCGAGG CCCGCAGCTA CT 82

配列番号 : 2 9

配列の長さ : 7 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成 DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

CTGCAGCACA AGTTCTACTG GATCGTCAAC GACCTTAGTC ACCTTAAGTG GTTCGAAAAC 60

GAGCTACAAT GGCTTAA 77

配列番号 : 3 0

配列の長さ : 7 7





配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成 DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

ACAATGGCTT AAGGAGAAAT CTTGTGAAGT CTCTGTCATC TACTACTGGGT CATCAGTGGA 60

GGATACAAAC TCAGATG 77

配列番号 : 3 1

配列の長さ : 7 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成 DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

CAAACCTCAGA TGAGTCCACT AAGGGTTTTCG ATGACAAGGA AGAATCTGAA ATCACCGTAG 60

AATGCCTTAA CAAGAGG 77

配列番号 : 3 2

配列の長さ : 7 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖



トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴：

特徴を表す記号： primer bind

配列：

GTGATGTTGT TGTTCCTCGAG TTCTGACAAT TTGATCTCTG ATCTCACTAG CTCTTTGAGG 60

TCTGGCCTCT TGTAAAG 77

配列番号：33

配列の長さ：77

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴：

特徴を表す記号： primer bind

配列：

CGATACCTTG TACAACTGCA TTCCTAAAGT CGTCATTGAA AGTCGCTGGT CCGCATGAGT 60

AGAAAGTGAT GTTGTTG 77

配列番号：34

配列の長さ：77

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA



配列の特徴：

特徴を表す記号： primer bind

配列：

AAGCTTGAGC TCTTACCAAG TAAAACTCTC CTCCTCTAGT TCGACATCTA TCTTCAGACT 60

AGAATCGATA CCTTGTA 77



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01481

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>6</sup> A01H5/00, C12N15/09, C12N15/31		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>6</sup> A01H5/00, C12N15/09, C12N15/31		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS, DDBJ, DDBJ new, GenBank new, EMBL new, GeneSeq		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X  Y	Hideya Fujimoto et al., BIO/TECHNOLOGY, vol. 11, p.1151-1155 (1993)	1, 5, 8, 13, 15-18, 21 2-4, 6, 7, 9-14, 19, 20
X  Y	Frederick J. Perlak et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 88, p.3324-3328 (1991)	1, 5, 8, 14-18, 21 2-4, 6, 7, 9-13 19, 20
X  Y	Rina Iannaccone et al., Plant Mol. Biol., vol. 34, p.485-496 (1997)	1, 5, 8, 15-18, 21 2-4, 6, 7, 9-14 19, 20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 22 June, 1999 (22. 06. 99)	Date of mailing of the international search report 6 July, 1999 (06. 07. 99)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01481

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Pamaela J. Green, Plant Physiol., vol. 102, p.1065-1070 (1993)	1, 5, 8, 15-18, 21 2-4, 6, 7, 9-14 19, 20
Y	Dancis A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 89, p.3869-3873 (1992)	20
Y	Johnston M. et al., NATURE, vol. 387 (6632 Suppl), p.87-90 (1997)	20
A	Brian Keith et al., The EMBO Journal, vol. 5, p.2419-2425 (1986)	1-21



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. <sup>°</sup> A01H 5/00, C12N 15/09, C12N 15/31

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. <sup>°</sup> A01H 5/00, C12N 15/09, C12N 15/31

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS, DDBJ, DDBJ new, GenBank new, EMBL new, GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Hideya Fujimoto et al., BIO/TECHNOLOGY, vol. 11, p. 1151-1155 (1993)	1, 5, 8, 13, 15-18, 21 2-4, 6, 7, 9-14, 19, 20
X Y	Frederick J. Perlak et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 88, p. 3324-3328 (1991)	1, 5, 8, 14-18, 21 2-4, 6, 7, 9-13 19, 20

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22. 06. 99

国際調査報告の発送日

06.07.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長 井 啓 子



2 B

9 1 2 3

電話番号 03-3581-1101 内線 3236

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Rina Iannacone et al., Plant Mol.Biol., vol.34, p.485-496 (1997)	1, 5, 8, 15-18, 21 2-4, 6, 7, 9-14 19, 20
X Y	Pamaela J.Green, Plant Physiol., vol.102, p.1065-1070 (1993)	1, 5, 8, 15-18, 21 2-4, 6, 7, 9-14 19, 20
Y	Dancis A. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, vol.89, p.3869-3873 (1992)	20
Y	Johnston M. et al., NATURE, vol.387(6632 Suppl), p.87-90 (1997)	20
A	Brian Keith et al., The EMBO Journal, vol.5, p.2419-2425 (1986)	1-21